

MARBURG

1968 ✓ 14

Der Einfluß verschiedener N-Quellen
auf die spezifischen Aktivitäten der Enzyme
des Ornithin-Cyclus bei
Endomycopsis vernalis und Torulopsis utilis

Mit einem Beitrag über die Urease
von Endomycopsis vernalis

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Leonhard Eckert

aus Weiten-Gesäss (Odenw.)

Marburg 1968

Der Einfluß verschiedener N-Quellen
auf die spezifischen Aktivitäten der Enzyme
des Ornithin-Cyclus bei
Endomycopsis vernalis und *Torulopsis utilis*

Mit einem Beitrag über die Urease
von *Endomycopsis vernalis*

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Leonhard Eckert

aus Weiten-Gesäss (Odenw.)

Marburg 1968

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 14. Juni 1968

Tag der mündlichen Prüfung am 6. Juli 1968

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kating

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Nultsch

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
<u>A. Einleitung und Problemstellung</u>	1
<u>B. Material und Methoden</u>	5
I. Kulturverfahren	5
1. Versuchsorganismen	5
2. Ansetzen der Versuchsreihen	5
3. Ernte und Trocknen des Pilzmaterials	7
II. Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten	8
1. Gewinnung des enzymatischen Rohmaterials	8
2. Herstellung des Acetontrockenpulvers	8
3. Enzymnachweise im Acetontrockenpulver	9
a) Bestimmung der Urease-Aktivität	9
b) Bestimmung der Carbamoylphosphat-synthetase-Aktivität	10
c) Bestimmung der Ornithincarbamoyl-transferase-Aktivität	11
d) Bestimmung der Aktivität der "argininsynthetisierenden Enzyme"	13
e) Bestimmung der Arginase-Aktivität	14
4. Eiweißbestimmung der Enzymextrakte	16
<u>C. Ergebnisse</u>	17
I. Ureasewirkung bei E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s und Nachweis der Ureasefreiheit von T o r u l o p s i s u t i l i s	17
1. Der Einfluß verschiedener Puffersysteme auf die Ureaseaktivität von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s	17
2. Der Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Urease-Aktivität	19
3. Versuche zum Nachweis einer Urease-Aktivität in T o r u l o p s i s u t i l i s	21
4. Der Einfluß von p-Chlormercuribenzoat und verschiedener Harnstoffderivate auf die Urease-Aktivität in E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s	23
a) Der Einfluß von p-Chlormercuribenzoat (p-CMB)	23
b) Der Einfluß verschiedener Harnstoffderivate auf die Urease-Aktivität von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s	26

5. Diskussion der bisherigen Ergebnisse	29
II. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus bei <i>Endomycopsis vernalis</i> und <i>Torulopsis utilis</i> in Abhängigkeit von der N-Quelle	32
1. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus von <i>Endomycopsis</i> und <i>Torulopsis</i> nach Kultur auf verschiedenen N-Quellen	33
a) Carbamoylphosphat-synthetase	33
b) Ornithincarbamoyl-transferase	36
c) "Argininsynthetisierende Enzyme"	38
d) Arginase	39
2. Diskussion der bisherigen Ergebnisse über die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus	40
III. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus bei Umpflanzkulturen von <i>Endomycopsis vernalis</i> und <i>Torulopsis utilis</i> in Abhängigkeit von der Kulturdauer	45
1. Vorversuche zu den Umpflanzkulturen	45
a) Unterschiedliche spezifische Aktivitäten der Enzyme bei N-armer und N-reicher Kultur	45
b) Bestimmung der Trockengewichtsproduktion nach Umpflanzung der Versuchsorganismen auf die zu prüfenden neuen N-Quellen	50
2. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus nach Umpflanzung auf Ammoniumsucinat, L-Alanin, L-Asparaginsäure, L-Asparagin und L-Glutaminsäure	55
3. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus nach Umpflanzung auf Harnstoff, L-Ornithin, L-Arginin und L-Citrullin	64
4. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus nach Umpflanzung von <i>Endomycopsis vernalis</i> auf Biuret, Thioharnstoff, Phenylharnstoff und Guanin	73
5. Die spezifische Aktivität der Urease von <i>Endomycopsis vernalis</i> nach Umpflanzung auf verschiedene N-Quellen	77
D. <u>Diskussion der Ergebnisse</u>	81
E. <u>Zusammenfassung</u>	86
F. <u>Arbeitsvorschriften</u>	90

	Seite
1. Ammoniakbestimmung nach der Conway-Methode	90
2. Aufstellung der Eichkurve zur Eiweißbestimmung	91
3. Berechnung einer spezifischen Enzymaktivität	92
4. Herstellung der Substratlösung für die Bestimmung der Carbamoylphosphat-synthetase-Aktivität	93
5. Herstellung von Diammonium-carbamoylphosphat	93
6. Aufstellung der Eichkurve zur Citrullinbestimmung	95
7. Herstellung der Substratlösung zur Bestimmung der Aktivität der "argininsynthetisierenden Enzyme"	98
8. Herstellung der Arginasepräparatlösung	99
9. Herstellung der Ureasepräparatlösung	99
10. Herstellung des Maleinsäure-NaOH-Puffers zur Arginase-Aktivitätsbestimmung	99
<u>G. Literaturverzeichnis</u>	100

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Rolle der Urease im Stoffwechsel pflanzlicher Organismen ist im Jahre 1951 von W. GRASSMANN u. H. MÜLLER folgendermaßen gekennzeichnet worden: "Die allgemeine Bedeutung der pflanzlichen Urease liegt in der Bereitstellung von assimilationsfähigem Ammoniak für die Pflanze durch Aufspaltung des zunächst wertlosen Harnstoffs aus dem Eiweißabbau".- Sechs Jahre später berichteten M. STEINER u. H. KATING (1957) über zwei Hefen - *Torulopsis utilis* und *Willisia anomala* - die keine Urease besitzen, aber dennoch auf Harnstoff als alleiniger N-Quelle gut zu wachsen vermögen. Weitere Untersuchungen an diesen Organismen ergaben, daß der Harnstoff auch ohne Aufspaltung in Ammoniak und Kohlendioxyd in den Stickstoff-Stoffwechsel einbezogen werden kann. H. KATING (1962b) hat nach Untersuchungen mit ^{14}C -markiertem Harnstoff hierfür eine Spaltung in einen Carbamylrest und in eine Aminogruppe postuliert. Während ersterer auf Ornithin (Citru-
linbildung) übertragen wird, reagiert die Aminogruppe mit α -Ketoglutar-säure zu Glutaminsäure. Beide Spaltprodukte des Harnstoffs werden, ohne daß sie frei auftreten, direkt auf ihre Akzeptoren übertragen.

Eine Harnstoffnutzung ohne Ureasewirkung ist in der Folgezeit bei verschiedenen Mikroorganismen und höheren Pflanzen beschrieben worden (s.u.a. E.G. BOLLARD, 1959; A.R. COOK u. D. BOULTER, 1964). Allerdings verweisen andere Autoren darauf, daß die Ureasewirksamkeit durch Hemmstoffe verzögert sein kann und somit eine Ureasefreiheit eventuell vorgetäuscht werde.

Tatsächlich sind in *Taraxacum officinale* (E. MÜLLER, 1961), *Populus berolinensis* und Salatsamen (I. REIFER u. G. MORAWSKA, 1963; I. REIFER u. B. WIELGAT, 1964 und M. DABROWSKA u. Mitarb., 1966) Inhibitoren der Urease gefunden worden.

Es liegt auf der Hand, daß eine Nutzung ohne Ureasewirksamkeit eine neue Rolle des Harnstoffs im Stoffwechsel der freien Stickstoffverbindungen in pflanzlichen Organismen darstellt. Wegen dieser Bedeutung schien es angebracht, die von M. STEINER u. H. KATING (1957) und H. KATING (1962b) beschriebene Ureasefreiheit von *Torulopsis utilis* einer eingehenden Prüfung zu unterziehen. Diese Untersuchungen sollten u.a. auch mit den Methoden durchgeführt werden, die von anderen Autoren (s. oben) zum Nachweis der gehemmten Urease angewandt worden waren.- Parallel zu diesen Analysen sollte die Urease des anderen Versuchsorganismus (*Endomycopsis vernalis*) näher charakterisiert werden.

In unmittelbarem Zusammenhang mit der Harnstoffnutzung durch pflanzliche Organismen steht die Harnstoffsynthese. Bei Amphibien und Säugetieren wird das aus dem Eiweißabbau stammende Ammoniak über den von KREBS u. HENSELEIT (1932) aufgestellten Kreisprozeß entgiftet und im Harnstoff aus dem Stoffwechsel ausgeschieden. Abb.1 gibt die heutigen Vorstellungen über den Ablauf des sogenannten Ornithin-Cyclus wieder.

Zunächst glaubte man, daß in pflanzlichen Organismen der vollständige Ornithin-Cyclus (bis zur Harnstoff-Freisetzung) nicht vorkommt. Teilprozesse des Cyclus sollten lediglich zur Bereitstellung von Citrullin und Arginin für die Eiweißsynthese

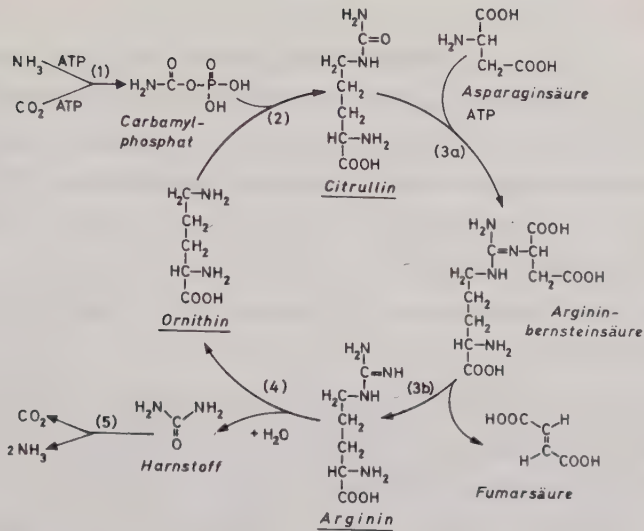


Abbildung 1: Die Harnstoffbildung durch den Ornithin-Cyclus

Enzyme: 1 Carbamoylphosphat-synthetase

2 Ornithincarbamoyl-transferase

3a und 3b "argininsynthetisierende Enzyme" (3a Argininosuccinat-synthetase, 3b Argininosuccinase)

4 Arginase, 5 Urease

dienen (K. MOTHES, 1961). In jüngster Zeit ist jedoch in verschiedenen Mikroorganismen und höheren Pflanzen der vollständige Ablauf des Ornithin-Cyclus nachgewiesen worden (A.M. SRB u. N.N. HOROWITZ, 1944; S. RATNER, 1955; I.R.S. FINCHAM u. J.B. BOYLEN, 1955; R. KASTING u. C.C. DELWICHE, 1958; I. REIFER u. L. BURACZEWSKA, 1958; G.W. BROWN u. P.P. COHEN, 1959; H.J. VOGEL u. D.M. BONNER, 1959; U. HIORT u. Mitarb., 1967). Auch in den Hefen *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis* wurde der Ornithin-Cyclus nachgewiesen

(H. KATING, 1962a). Im Zusammenhang mit der Harnstoffnutzung mit und ohne Ureasewirksamkeit weist H. KATING (1962a,b; 1963) darauf hin, daß der Ornithin-Cyclus beim pflanzlichen Organismus nicht wie bei Amphibien und Säugetieren zur Ammoniakentgiftung dient, sondern daß er neben der direkten Aminierung von α -Ketosäuren einen zweiten Weg der Ammoniakassimilation darstellt. In diesem Sinne äußern sich auch I. WITT u. H. HOLZER (1964), die vermuten, daß bei Bäckerhefe etwa ein Drittel des gebotenen Ammoniaks zur Biosynthese von Carbamylphosphat verbraucht wird.

Über die spezifischen Aktivitäten aller Enzyme des Ornithin-Cyclus in Mikroorganismen sind bisher nur aus unserem Laboratorium einige orientierende Untersuchungen veröffentlicht worden (L. ECKERT u. Mitarb., 1966; U. HIORT u. Mitarb., 1967). Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es deshalb weiterhin, diese für die Assimilation des Ammoniums und zur Synthese des Harnstoffs führenden Prozesse hinsichtlich der spezifischen Enzymaktivitäten eingehend zu analysieren. Außerdem sollte die Abhängigkeit der spezifischen Aktivitäten vom Wachstum der Versuchorganismen auf verschiedenen N-Quellen festgestellt werden, um eventuelle Regulationsmechanismen im Ornithin-Cyclus zu finden.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. KULTURVERFAHREN

1. Versuchsorganismen

Die Untersuchungen wurden mit den Institutsstämmen *Endomycopsis vernalis* (Ludwig) und *Torulopsis utilis* (Henneberg) Lodder durchgeführt. Die Pilze wurden als Dauerkulturen auf Malzagar (2% Agar-Agar, Fa. Merck; 4% Biomalz; 0,003% Streptomycinsulfat, Fa. Grünenthal) in Schrägagarröhrchen im Kühlschrank gehalten. Vor Beginn einer Versuchsreihe wurde zur Gewinnung der für die Animpfung verwandten Zellen von der Dauerkultur auf neue Schrägagarröhrchen umgeimpft und diese 3 Tage lang im Brutschrank bei 20°C vorkultiviert.

2. Ansetzen der Versuchsreihen

Die Hefen wurden nach dem bei S. HEIDE (1939) beschriebenen Verfahren als Oberflächenkulturen gezogen. Dies Kulturverfahren wurde in einigen Punkten zur nachfolgend beschriebenen Methode abgeändert: Als Kulturschalen dienten Petrischalen von 9 cm Durchmesser, in die 34 g grober, gewaschener und geglühter Quarzsand (p.a., Fa. Merck)^{*)} gegeben wurden. Die so vorbereiteten Schalen wurden 2 Std. im Trockenschrank bei 140°C sterilisiert. Weiterhin wurden für jede Petrischale 2 Rundfilter (Fa. Schleicher u. Schüll) von 8,8 cm Durch-

^{*)} Nach beendeter Kultur wurde der Quarzsand wieder gereinigt. Dazu wurde er jeweils 2 Std. mit verdünnter Salzsäure und anschließend mit schwacher Natriumcarbonatlösung auf dem Wasserbade gekocht. Nach sorgfältigem Spülen mit deionisiertem Wasser und Trocknung bei 140°C war der Quarzsand wieder gebrauchsfertig.

messer, sowie eine Anzahl Pinzetten und rechtwinklig gebogene Gl¹st¹äbchen trocken sterilisiert.

Als Nährlösung diente das vollsynthetische Medium nach W. WÖLTJE (1918). Sie enthält in 100 ml deionisiertem Wasser:

1,0 g L-Asparagin (Fa. Merck)

0,5 g Kaliumdihydrogenphosphat (nach SÖRENSEN, Fa. Merck)

0,25 g Magnesiumsulfat $\cdot$ 7 H₂O (Fa. Merck)

7,5 g Saccharose reinst (Fa. Merck)

Je nach Versuchsansatz wurde die N-Quelle L-Asparagin durch N-äquivalente Mengen anderer organischer Stickstoffverbindungen (Harnstoff, Ammoniumsuccinat, L-Arginin, L-Citrullin, L-Ornithin) ersetzt. Die Nährlösungen wurden mit 0,1 n HCl bzw. 0,1 n NaOH auf den pH-Wert 4,5 eingestellt und im Dampftopf dreimal fraktioniert sterilisiert.

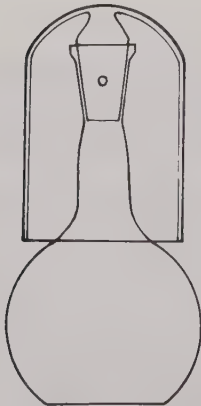


Abbildung 2: Schüttelkölbchen
(Inhalt 100 ml)

Zur Herstellung der Impfsuspension wurden die vorgezogenen Hefezellen mit einer Platinöse vom Schrägagar in ein mit 60 ml sterilisiertem Leitungswasser gefülltes Schüttelkölbchen (Abb.2) übertragen. Durch kräftiges Schütteln bildete sich eine homogene Suspension.

Vor der Animpfung wurden 14,5 ml der sterilisierten Nährlösung in die vorbereiteten Kulturschalen einpipettiert. Auf die durchtränkte Quarz-

sandschicht wurden nacheinander zwei sterilisierte Rundfilter gelegt. Auf das oberste Filter wurde mit der Impfpipette 0,5 ml Zellsuspension gegeben und dann mit dem rechtwinklig abgebogenen Glasstab gleichmäßig ausgestrichen. *Endomyces vernalis* wurde bei 18 - 21°C und *Torulopsis utilis* bei 20 - 23°C im Brutschrank in Dunkelheit kultiviert.

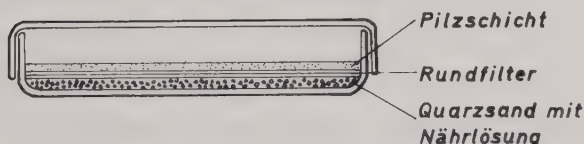


Abbildung 3: Schematischer Querschnitt der beimpften Kulturschale

3. Ernte und Trocknen des Pilzmaterials

Zur Ernte wurde das oberste Rundfilter mit der Pilzdecke abgehoben, auf den Deckel der Schale gelegt, das Mycel mit einem breiten, weichen Spatel abgekratzt und in ein dünnwandiges Zentrifugenglas (30 ml Inhalt) überführt. Das Mycel wurde in Leitungswasser suspendiert und bei 3000 U/Min. 10-15 Min. zentrifugiert. Das Material wurde insgesamt dreimal gewaschen und zentrifugiert. Dann wurde das Pilzmaterial zur Inaktivierung der Enzyme 30 Min. lang auf 70°C erhitzt und danach in einem heizbaren Vakuumexsikkator bei 60°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Hierbei verblieb das Zellmaterial in den Zentrifugengläschen, deren Leergewichte vorher bestimmt worden waren.

Die Trockengewichte wurden stets aus zwei Kulturschalen gemittelt. Die Erntezeiten werden bei den jeweiligen Versuchsansätzen angegeben.

II. BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN ENZYMAKTIVITÄTEN

1. Gewinnung des enzymatischen Rohmaterials

Hierzu wurden die Pilzdecken nach dem Abstreichen dreimal mit je 50 ml gekühltem deionisiertem Wasser (4°C) in dickwandigen Zentrifugengläsern gewaschen und in einer gekühlten Zentrifuge (UJ III, Fa. Christ) bei 7°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$), Temperatur im Windkessel, 10 Min. mit 4500 U/Min. zentrifugiert. Anschließend wurde das Frischmaterial im Tiefkühlschrank bei -25°C bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren.

2. Herstellung des Acetontrockenpulvers

Das im Tiefkühlschrank gelagerte (1 bis 4 Tage alte) Pilzmaterial wurde schnell im Wasserbad ($70 - 80^{\circ}\text{C}$) unter Umrühren aufgetaut, mit dem zehnfachen Volumen gekühlten Acetons (-25°C) gut gemischt und im vorgekühlten Homogenisator (MSE-Gerät) dreimal 15 Sek. in Aceton homogenisiert. Das Zellhomogenat wurde auf einer G_2 -Fritte dreimal mit der gleichen Menge Aceton gewaschen, an der Luft bei Zimmertemperatur auf Filterpapier bis zur Acetonfreiheit getrocknet und mit einem Glasstab pulverisiert. Zur vollständigen Trocknung wurde das so erhaltene Acetontrockenpulver im Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxyd und festem Paraffin im Kühlschrank aufbewahrt. Nach ca. 12 Std. war das Material für die Enzymnachweise gebrauchsfertig.

Dieses Herstellungsverfahren hat den Vorteil, daß in der hochprozentigen kalten Acetonlösung die Proteine unlöslich sind, die Zellflüssigkeit vom Aceton aufgenommen wird und auch die lipoidhaltigen Zellstrukturen zerstört werden. Bei einer anschließenden Extraktion des feinen Acetonrockenpulvers mit gepufferten wäßrigen Lösungen gehen dann die meisten Proteine in Lösung.

3. Enzymnachweise im Acetonrockenpulver

a) Bestimmung der Urease-Aktivität

[Urease (Urea: Amidohydrolase EC 3.5.1.5.)]

Zur Gewinnung des Ureasepräparates wurden 100 mg Acetonrockenpulver von *Endomycopsis vernalis* in 10 ml Wasser in einem Zentrifugenglas unter Eiskühlung (Wasser-Eis-Mischung) durch Umrühren mit einem Glasstab suspendiert. Die Extraktionsdauer betrug 5 Min. Danach wurde die Suspension 10 Min. lang bei 5000 x g und +4°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) zentrifugiert und der Überstand durch Watte filtriert.

Zum Nachweis der Urease-Aktivität (J.B. SUMNER, 1955) wurden in Halbmikroreagenzgläser, die in einer Wasser-Eis-Mischung standen, je Probe einpipettiert: 0,2 - 0,5 ml Extrakt (je nach Versuchsansatz und Eiweißgehalt wechselnde Mengen); 0,1 ml Harnstofflösung (10 μmol Harnstoff, Fa. Merck); 0,1 ml L-Cysteinlösung (5 μmol L-Cystein, Fa. Schuchardt) als SH-Gruppen-Protector; 0,2 ml 0,5 mol Tris-SO₄-Puffer mit dem pH-Wert 8,0 oder Phosphat-Puffer (nach SÖRENSEN) pH-Wert 6,7 und Wasser zu 1,0 ml Gesamtvolumen. Die Kontrollansätze enthielten keinen Harnstoff. Die Reaktionsdauer betrug 30 Min. bei 37°C im Ultrathermostaten. Bei Versuchsabbruch wurden die

Proben in eine Wasser-Eis-Mischung gestellt und möglichst schnell zur Ammoniakbestimmung in Conway-Schalen überführt. Das aus den Proben freigesetzte Ammoniak wurde nach Absorption im zentralen Borsäure-Indikator-Gefäß mit $n/100$ HCl titriert (E.J. CONWAY, 1962).

Die Ammoniakbestimmung wurde nach der von E.J. CONWAY (1935) und später verbesserten Methode (E.J. CONWAY u. E. O'MALLEY, 1942, sowie E.J. CONWAY, 1962) durchgeführt. Mit dieser Methode können auch Ammoniakmengen von 10 γ genau erfaßt werden.

Die spezifische Aktivität der Urease unter den obengenannten Bedingungen wurde in μmol gespaltenen Harnstoff pro mg Eiweiß berechnet (Eiweißbestimmung s.S. 16; Berechnung der spezifischen Aktivität und Ammoniakbestimmung s. unter Arbeitsvorschriften S.90ff).

b) Bestimmung der Carbamoylphosphat-synthetase-Aktivität
Carbamoylphosphat-synthetase [ATP: Carbaminatphosphotransferase (dephosphorilierend) EC 2.7.2.5.]

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase wurde das durch den Acetonpulver-Extrakt gebildete Citrullin gemessen. Hierzu wurden zunächst 100 mg Acetontrockenpulver 5 Min. lang mit 3 ml 0,1 mol Tris-HCl-Puffer vom pH-Wert 7,6 unter Eiswasserkühlung extrahiert und mit $5000 \times g$ bei $+4^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) zentrifugiert. In Halbmikroreagenzgläsern wurden dann je Probe zugegeben (K. KLECZKOWSKI, 1965): 0,5 ml Extrakt (0,6 - 1,0 mg Eiweiß); 0,1 ml 0,5 mol Tris-HCl-Puffer mit dem pH-Wert 7,6; 0,2 ml Substratlösung (s.S. 93)[enthaltend: 5 μmol Adenosin-5'-triphosphat-Na-Salz (Fa. Boehringer); 5 μmol Phosphoenol-pyruvat (Fa. Boehringer);

5 μmol L-Ornithin-HCl (Fa. Merck); 15 μmol Magnesiumsulfat $\cdot$ 7 H_2O (Fa. Merck)]; als N-Donator für die Carbamylphosphat-Synthese entweder 0,1 ml Glutaminlösung (20 μmol L-Glutamin, Fa. Schuchardt) oder 0,1 ml Ammoniumsulfatlösung (20 μmol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Fa. Merck); 0,1 ml Natriumbicarbonatlösung (40 μmol NaHCO_3 , Fa. Merck); 0,1 ml Pyruvat-kinase-Lösung (60 Bücher-E., Fa. Boehringer); mit Wasser wurde zu 1,0 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.-Ornithincarbamoyl-transferase wurde nicht dazugegeben, weil sie im Extrakt bereits vorhanden ist (s.S. 12). Bei den Kontrollproben wurde der Extrakt mit der Pufferlösung zur Denaturierung des Eiweißes 5 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt, bevor die übrigen Reagenzlösungen, außer 0,2 ml Substratlösung, dazugegeben wurden.

Die Reaktionsdauer im Ultrathermostaten (Fa. Haake, Typ NBS) betrug 60 Min. bei 37°C . Danach wurde je Probe 0,1 ml Perchlorsäure (60%, Fa. Merck) zugegeben, das ausgefällte Eiweiß abzentrifugiert und das synthetisierte Citrullin nach der Archibald-Methode (R.M. ARCHIBALD, 1944) bestimmt (ausführliche Darstellung der Citrullinbestimmung s.S.95 unter Arbeitsvorschriften).

Die spezifische Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase unter den obengenannten Bedingungen wurde in μmol gebildetes Citrullin je 1 mg Eiweiß berechnet.

c) Bestimmung der Ornithincarbamoyl-transferase-Aktivität
[Ornithincarbamoyl-transferase (Carbamylphosphat: L-Ornithincarbamoyl-transferase EC 2.1.3.3.)]

Zur Bestimmung wurden jeweils 5 - 20 mg Acetontrockenpulver in 3 ml 0,02 molarem Phosphat-Puffer (nach SÖRENSEN) mit dem

pH-Wert 7,4 im Zentrifugenglas unter Eiswasserkühlung durch Umrühren mit einem Glastab suspendiert. Nach 5 - 10 Min. Extraktionsdauer wurde 10 Min. lang mit 5000 x g zentrifugiert und der Überstand durch Watte filtriert. Zum Enzymnachweis wurden in mit Eiswasser gekühlte Halbmikroreagenzgläser zusammengegeben (J. CARAVACA u. S. GRISOLIA, 1960): 0,2 ml Extrakt (10-20 mg Eiweiß); 0,2 ml 0,5 mol Diäthanolamin-Lösung^{*)}, die mit Essigsäure auf den pH-Wert 8,45 gebracht worden war; 0,1 ml (20 µmol) Carbamylphosphat-diammoniumsalzlösung; 0,1 ml (20 µmol) L-Ornithin-HCl-Lösung (Fa. Merck) und deionisiertes Wasser auf 1,0 ml Gesamtvolumen.- Bei den Kontrollproben wurde der Extrakt, bevor die Carbamylphosphat- und Ornithinlösung zugegeben wurden, mit der Pufferlösung 5 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt.

Die Reaktionsdauer betrug 15 Min. bei 37°C im Ultrathermostaten. Danach wurde je Probe 0,1 ml Perchlorsäure (60%, Fa. Merck) zugegeben. Das ausgefällte Eiweiß wurde abzentrifugiert und das synthetisierte Citrullin nach der Archibald-Methode (R.M. ARCHIBALD, 1944) bestimmt (Citrullinbestimmung s.S. 95 unter Arbeitsvorschriften).

Die spezifische Aktivität der Ornithincarbamoyl-transferase unter den obengenannten Bedingungen wurde in µmol gebildetes Citrullin je 1 mg Eiweiß berechnet.

^{*)} Im Enzymnachweis wurde der Tris-Puffer pH-Wert 8,5 durch den Diäthanolamin-Puffer pH-Wert 8,45 nach K. KLECZKOWSKI u. P.P. COHEN (1964) ersetzt. Vorversuche ergaben, daß die Extraktbereitung aus dem Acetontrockenpulver nicht mit dem Diäthanolamin-Puffer durchgeführt werden durfte, weil dieser bei der Eiweißbestimmung des Extraktes störte. Zur Enzymstabilisierung bei der Extraktion wurde deshalb der verdünnte 0,02 mol Phosphat-Puffer verwendet.

Das benutzte Diammonium-carbamylphosphat wurde nach der von R.L. METZENBERG u. Mitarb. (1960) beschriebenen Methode präparativ dargestellt (s.S.93 unter Arbeitsvorschriften).

- d) Bestimmung der Aktivität der "argininsynthetisierenden Enzyme": Argininosuccinat-synthetase [AMP (L-Citrullin: L-Asparagin-ligase EC 6.3.4.5.)]; Argininosuccinase (L-Argininosuccinat: Arginin-lyase EC 4.3.2.1.)

100 mg Acetontrockenpulver wurden mit 3 ml einer 0,1 molaren Phosphat-Puffer-Lösung (pH-Wert 7,4) 5 Min. lang unter Eiswasser-Kühlung extrahiert und zentrifugiert. Zum Nachweis der "argininsynthetisierenden Enzyme" wurden in mit Eiswasser gekühlte Halbmikroreagenzgläser einpipettiert (S. RATNER, 1955): 0,5 ml Extrakt (0,6 - 1,0 mg Eiweiß); 0,1 ml 0,5 mol Phosphat-Puffer (pH-Wert 7,4); 0,2 ml Substratlösung (s.S. 98) [enthaltend: 5 μ mol Adenosin-5'-triphosphat-Na-Salz (Fa. Boehringer); 10 μ mol L-Citrullin (Fa. Serva); 10 μ mol L-Asparaginsäure (Fa. Merck) und 10 μ mol Magnesiumsulfat $\cdot$ 7 H₂O (Fa. Merck)].- Die Kontrollproben wurden ohne Substratlösung 5 Min. lang im siedenden Wasserbad erhitzt. Erst danach wurden alle Proben mit der Substratlösung für 30 Min. bei 37°C belassen und anschließend zu jeder Probe 0,1 ml Lösung des Arginasepräparates (s.S. 99) (Arginase "Sigma" 1,3 Van Slyke-Archibald-E.) und 0,1 ml Ureasepräparatlösung (s.S. 99) (50 γ Urease, Fa. Merck, 250 000 Sumner-E. pro 1 g) zugefügt. Nach weiteren 30 Min. Reaktionszeit bei 37°C wurden die Proben in Eiswasser gestellt. Das in der ersten Reaktion gebildete Arginin war nun gespalten und der Harnstoff-N (Urease-Zusatz) wurde als Ammoniak nach der Conway-Methode (CONWAY, 1962) (s.S. 90) bestimmt.

Die spezifische Aktivität der "argininsynthetisierenden Enzyme" unter den obengenannten Bedingungen wurde in μmol abgespaltenen Harnstoff je 1 mg Eiweiß berechnet.

e) Bestimmung der Arginase-Aktivität

Arginase (L-Arginin: Ureidohydrolase EC 3.5.3.1.)

Zur Extraktgewinnung wurden 30 mg Acetontrockenpulver mit 3 ml deionisiertem Wasser 5 Min. lang unter Eiswasserkühlung extrahiert und zentrifugiert. Zum Enzymnachweis wurden folgende Reagenzien in mit Eiswasser gekühlte Halbmikroreagenzgläser einpipettiert: 0,5 ml Extrakt (0,1 - 0,3 mg Eiweiß); 0,2 ml 0,5 mol Tris-Maleinsäure-NaOH-Puffer (J. STAUFF u. R. JAE-NICKE, 1964) mit dem pH-Wert 7,0; 0,1 ml L-Argininlösung (40 μmol L-Arginin, Fa. Schuchardt), eingestellt auf den pH-Wert 7,0; 0,1 ml Kobaltsulfatlösung (5 μmol Kobaltsulfat, Fa. Merck) und 0,1 ml Ureaselösung (50 γ Urease "Merck", 250 000 Sumner-E. pro 1 g). Der Extrakt und die Pufferlösung der Kontrollproben wurden zur Inaktivierung der Enzyme 5 Min. lang im siedenden Wasserbad erhitzt, bevor die Arginin- und Ureaselösung zugegeben wurden.

Die Reaktionsdauer betrug 30 Min. bei 37°C (Ultrathermostat). Danach wurden die Proben in Eiswasser gestellt und das aus dem abgespaltenen Harnstoff gebildete Ammoniak nach der Conway-Methode bestimmt. Die spezifische Aktivität der Arginase wurde in μmol abgespaltenen Harnstoff je 1 mg Eiweiß berechnet.

Für die unter den obengenannten Bedingungen durchgeführte Bestimmung der spezifischen Arginase-Aktivität ist die Methode von D.M. GREENBERG (1955) in einigen Punkten abgewandelt wor-

den: Vorversuche mit Maleinsäure-NaOH-Puffer (pH-Wert 7,0) mit MnSO_4 -Zusatz (s.S. 99) und Tris-Maleinsäure-NaOH-Puffer (pH-Wert 7,0) mit CoSO_4 -Zusatz ergaben, daß letzterer eine höhere spezifische Aktivität der Arginase bewirkt (Tab.1).

Tabelle 1: Der Einfluß, des Puffers auf die Arginase-Aktivität im Acetonpulver-Extrakt von *Endomycopsis* und *Torulopsis*.

Puffer im Versuchsansatz	Spez. Arginase-Aktivität in μmol Harnstoff/mg Eiweiß/30 Min./37°C	
	Endomycopsis	Torulopsis
0,1 mol Maleinsäure-NaOH + MnSO_4 ; pH 7,0	0,80	0,15
0,1 mol Tris-Maleinsäure-NaOH + 5 μmol CoSO_4 ; pH 7,0	1,04	0,23

Weiterhin erwies es sich, daß zur Enzymaktivierung ein Austausch der Mn^{++} -Ionen gegen Co^{++} -Ionen die Versuchsdauer durch Wegfall der 3-stündigen Präinkubation wesentlich verkürzt. Bei einer Konzentration von 4 - 6 μmol Co^{++} -Ionen (CoSO_4) in 1 ml Reaktionslösung hat die Arginase-Aktivität ihr Optimum (Tab.2).

Tabelle 2: Der Einfluß der Co^{++} -Ionenkonzentration auf die Arginase-Aktivität im Acetonpulver-Extrakt von *Endomycopsis* in 0,1 mol Tris-Maleinsäure-NaOH-Puffer mit dem pH-Wert 7,0

Co^{++} -Ionen in $\mu\text{mol}/\text{ml}$	1	2	3	4	5	6
Spez. Arginase-Aktivität in μmol Harnstoff/mg Eiweiß/ 30 Min./37°C	2,15	2,21	2,15	2,36	2,40	2,38

In weiteren Vorversuchen wurden als optimale Argininkonzentration für die enzymatischen Ansätze 40 $\mu\text{mol/ml}$ ermittelt (Tab.3).

Tabelle 3: Der Einfluß der Argininkonzentration auf die Arginase-Aktivität im Acetonpulver-Extrakt von *Endomycopsis* in 0,1 mol Tris-Maleinsäure-NaOH-Puffer mit dem pH-Wert 7,0

L-Arginin in $\mu\text{mol/ml}$	20	40	80	120	160
Spez. Arginase-Aktivität in $\mu\text{mol Harnstoff/mg Eiweiß/30 Min./37}^{\circ}\text{C}$	1,75	2,60	1,90	0,90	0,54

4. Eiweißbestimmung der Enzymextrakte

Der Eiweißgehalt aller Enzymextrakte (meist Acetonpulver-Extrakte) wurde nach der Methode von O.H. LOWRY u. Mitarb. (1951) mit dem Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz bestimmt. Dazu wurden die Extrakte je nach Enzymnachweis und der eingewogenen Pulvermenge unterschiedlich verdünnt. Die zur Eiweißbestimmung benutzten Extraktmengen waren beim Nachweis der Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase 20 μl , der Ornithincarbamoyl-transferase 200 μl , der "argininsynthetisierenden Enzyme" 20 μl , der Arginase 40 μl und der Urease 50 μl . Dann wurde mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt und je Probe 5 ml Eiweißreagenzlösung hinzugefügt. Die Transmission der Reaktionslösung wurde im Spektralphotometer bei 750 nm gegen den Blindwert gemessen. Aus einer Eichkurve konnte der Eiweißgehalt der Proben in γ -Mengen entnommen werden (Herstellung der Eiweißreagenzlösung, Meßvorgang und Eichkurve s.S.91f unter Arbeitsvorschriften).

C. ERGEBNISSE

I. UREASEWIRKUNG BEI E N D O M Y C O P S I S V E R N A L I S
UND NACHWEIS DER UREASEFREIHEIT VON T O R U L O P S I S
U T I L I S

E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s spaltet Harnstoff mittels einer stark wirksamen Urease, T o r u l o p s i s u t i l i s hingegen ist ureasefrei (M. STEINER u. H. KATING, 1957, 1961). Da T o r u l o p s i s mit Harnstoff als alleiniger N-Quelle aber gut wächst, wurde eine Nutzung des Harnstoffs ohne Ureasewirkung postuliert (H. KATING, 1962b). Der Arbeitskreis um MOTHES hat allerdings in T a r a x a c u m o f f i c i n a l e nachgewiesen, daß die Abwesenheit von Urease durch eine starke Inhibierung vorgetäuscht werden kann (E. MÜLLER, 1961). Die Arbeitsgruppe von I. REIFER hat in P o p u l u s b e r o l i n e n s i s und in Salatsamen einen Ureasehemmstoff gefunden (I. REIFER u. G. MORAWSKA, 1963; I. REIFER u. B. WIELGAT, 1964; M. DABROWSKA u. Mitarb., 1966). Die letztgenannten Befunde führen zwangsläufig zu der Frage, ob nicht auch bei T o r u l o p s i s eine gehemmte Urease vorliegt und zu falschen Schlußfolgerungen geführt hat. Ziel der folgenden Untersuchungen war es, die E n d o m y c o p s i s -Urease näher zu kennzeichnen und gleichzeitig mit neuen Methoden kritisch zu prüfen, ob T o r u l o p s i s tatsächlich ureasefrei ist.

1. Der Einfluß verschiedener Puffersysteme auf die Urease-
Aktivität von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s

Urease katalysiert die Harnstoff-Hydrolyse nach der Gleichung:



Nach M.C. WALL u. K.J. LAIDLER (1953) ist die Ureasewirksamkeit im Tris-SO₄-Puffer (pH-Wert 8,0) stärker als im üblicherweise verwendeten Phosphat-Puffer (pH-Wert 6,7). Vorversuche mit beiden Puffersystemen ergaben, daß die Urease im Acetonpulver-Extrakt von *Endomyces* im Tris-SO₄-Puffer-Medium fünf- bis sechsmal mehr Ammoniak aus Harnstoff freisetzt als im vergleichbaren Ansatz mit Phosphat-Puffer (Tab.4). Die Titrierwerte der Kontrollproben (Puffersysteme mit Acetonpulver-Extrakt; s. die beiden letzten Spalten in Tab.4) zeigen keine signifikanten Unterschiede. Damit wird ausgeschlossen, daß die höhere Urease-Aktivität im Tris-SO₄-Puffer eventuell durch eine verstärkte Freisetzung von Ammoniak aus dem Harnstoff in diesem Versuchsansatz vorgetäuscht wird.

Tabelle 4: Der Einfluß des Phosphat-Puffers vom pH-Wert 6,7 und des Tris-SO₄-Puffers vom pH-Wert 8,0 auf die spezifische Urease-Aktivität in Acetonpulver-Extrakten von *Endomyces*

Versuchs- ansatz Nr.	Spez. Urease-Aktivität in µmol Harnstoff/mg Eiweiß/ 30 Min. 37°C		Titrierwerte der Kontrollproben n/100 HCl in ml	
	0,1 mol Tris- SO ₄ -Puffer pH 8,0	0,1 mol Phos- phat-Puffer pH 6,7	Tris- SO ₄ - Puffer	Phosphat- Puffer
1	10,6	1,90	0,010	0,010
2	10,0	1,92	0,011	0,010
3	9,3	1,93	0,019	0,017
4	9,6	1,62	0,023	0,023

Dieser Befund ist bemerkenswert, weil E. MÜLLER (1961) im Homogenat von *Taraxacum officinale* mit Phos-

phat-Puffer und Tris-SO₄-Puffer prinzipiell zu gleichen Urease-Aktivitäten kam.

2. Der Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Urease-Aktivität

Es sollte zunächst der Einfluß verschiedener N-Quellen (je-
weils N-äquivalent zu 1% Asparagin in der Wöltje-Nährlösung)
auf die Urease-Aktivität im Acetonpulver-Extrakt von *E n d o m y c o p s i s* und *T o r u l o p s i s* geprüft werden. Nach
den Ergebnissen aus den Vorversuchen wurden die spezifischen
Aktivitäten der Urease im Tris-SO₄-Puffer gemessen.

Versuchsansatz: Zur Prüfung der Urease-Aktivität von *E n d o m y c o p s i s* und *T o r u l o p s i s* wurden beide Hefen auf
1% Asparagin oder N-äquivalenten Mengen von Ammoniumsuccinat,
Harnstoff, L-Arginin bzw. L-Ornithin angezogen. Nach 3 1/2 Ta-
gen Kulturdauer wurde das Pilzmaterial geerntet, ein Teil als
Frischmaterial zum Enzymnachweis benutzt und der restliche
Teil zu Acetontrockenpulver verarbeitet.- Bei kühler Aufbewah-
rung des Pulvers im Exsikkator traten innerhalb mehrerer Mo-
nate nur geringe Verluste der Urease-Aktivität auf.

Tab.5 gibt die Ergebnisse mit dem Acetonpulver-Extrakt von
E n d o m y c o p s i s im Tris-SO₄-Puffer wieder. Beim Wachs-
tum auf Harnstoff (Versuchsansatz Nr.1 und 2), L-Arginin (Nr.3
bis 5) und L-Asparagin (Nr.6 und 7) liegt praktisch kein we-
sentlicher Unterschied in der spezifischen Urease-Aktivität
(8,0 - 9,6) vor. Nur wenn L-Ornithin (Nr.8 und 9) oder Ammo-
niumsuccinat (Nr.10 und 11) als N-Quelle geboten werden, ist
die spezifische Aktivität der Urease wesentlich geringer (6,0-
6,7).- Ein Zusatz von 5 µmol/ml Cystein als SH-Gruppen Pro-
tektor zu den Ansätzen hatte keine signifikante Steigerung
der Urease-Aktivität zur Folge.

In allen Versuchsansätzen war der Gehalt an präformiertem
Ammonium praktisch gleich. Es kann deshalb nicht die geringere

spezifische Aktivität der Urease, die in den auf Ammoniumsuccinat gewachsenen Zellen gefunden wurde, auf eine Hemmung durch vermehrte Anwesenheit von NH_4^+ -Ionen im Versuchsansatz zurückgeführt werden. Die deutlich verminderte spezifische Aktivität in diesem Ansatz läßt vielmehr vermuten, daß eine Hemmung der Urease-Synthese durch das als N-Quelle gebotene Ammoniumsalz vorliegt.

Tabelle 5: Spezifische Urease-Aktivität im Acetonpulver-Extrakt von *Endomycopsis* nach Wachstum auf verschiedenen N-Quellen. Tris- SO_4 -Puffer-Medium vom pH-Wert 8,0.

Versuchsansatz Nr.	N-Quelle für die Anzucht von <i>Endomycopsis</i>	Spez. Aktivität der Urease in μmol Harnstoff/mg Eiweiß/30 Min. 37°C
1	Harnstoff	9,5
2	Harnstoff	8,0
3	L-Arginin	9,6
4	L-Arginin	8,3
5	L-Arginin	9,5
6	L-Asparagin	8,0
7	L-Asparagin	8,3
8	L-Ornithin	6,6
9	L-Ornithin	6,6
10	Ammoniumsuccinat	6,7
11	Ammoniumsuccinat	6,0

Für die Verminderung der spezifischen Urease-Aktivität nach Kultur des Pilzes auf L-Ornithin als alleinige N-Quelle kann keine befriedigende Erklärung gegeben werden. Nach den Befunden von K.T. KOSSMANN u. Mitarb. (1964) hemmt Ornithin in Präparaten der Schweinelunge die Arginase-Aktivität. Möglicherweise besteht eine Abhängigkeit zwischen der Arginase-Aktivität und der Urease-Synthese. Es sei hier schon darauf verwiesen, daß nach Wachstum von *Endomycopsis* auf L-Orni-

thin -im Vergleich zum Wachstum auf den anderen Aminosäuren des Ornithin-Cyclus- alle Enzyme dieses Kreisprozesses die geringste spezifische Aktivität aufweisen (s.S. 35).

Bei den unter gleichen Bedingungen durchgeführten Analysen mit dem Acetonpulver-Extrakt von *T o r u l o p s i s* wurde keine Ureasewirksamkeit gefunden.

3. Versuche zum Nachweis einer Urease-Aktivität in *T o r u l o p s i s u t i l i s*

Es lag nahe, die Befunde von M. STEINER u. H. KATING (1957, 1961) und H. KATING (1962b) über das Fehlen der Urease in *T o r u l o p s i s u t i l i s* wegen der Bedeutung der daraus gezogenen Schlüsse eingehend nachzuprüfen. Zunächst wurde versucht, im bewährten Tris-SO₄-Puffer die Urease in folgenden Präparaten nachzuweisen:

- a) Im Extrakt aus frischen zerriebenen Zellen (Homogenisierung der Zellen mit Kieselgur im gekühlten Achatmörser und anschließende Zentrifugierung);
- b) im Acetonpulver-Extrakt.

Die Ergebnisse sind kurz zusammengefaßt folgende: In allen Versuchsansätzen konnte keine Urease-Aktivität nachgewiesen werden. Auch der Zusatz verschiedener SH-Gruppen-Protektoren zur Reaktionslösung (L-Cystein, Glutathion, Cysteamin und 2-Mercaptoäthanol) bewirkte keine NH₃-Freisetzung aus dem Harnstoff-Substrat.

Trotz dieser negativen Ergebnisse sollten zur weiteren Absicherung der Ureasefreiheit von *T o r u l o p s i s* eventuell vorliegende Urease-Hemmstoffe aus den Enzympräparaten entfernt werden. Hierzu wurden folgende Verfahren zur Reini-

gung und Aktivierung der Extrakte beziehungsweise zur Inaktivierung des Ureasepräparates angewandt:

- a) Fällung des Acetonpulver-Extraktes mit Ammoniumsulfatlösung (80%ig) und Entsalzung an einer Sephadex-G 25 (fein)-Säule (10 mm Durchmesser, 150 mm Länge).
- b) Fraktionierung des Acetonpulver-Extraktes an einer Sephadex-G 25 (fein)-Säule in drei Eiweiß-Fractionen von je 10 ml, die auf Ureasewirksamkeit geprüft wurden.
- c) Eine Suspension frischer Zellen wurde zur Aktivierung einer eventuell gehemmten Urease 20 Min. lang mit H_2S begast, im gut gekühlten Achatmörser homogenisiert, abzentrifugiert und in den Überstand vor dem Versuchsansatz zum Ureasenachweis nochmals 5 Min. lang H_2S eingeleitet.
- d) Die Acetonpulver-Suspension und der Acetonpulver-Extrakt wurden für 20 Min. mit H_2S begast.
- e) Der Acetonpulver-Extrakt wurde zum Nachweis eventuell darin enthaltener Urease-Hemmstoffe zu einem Ureasepräparat mit 7000 Sumner-Einheiten/mg (isoliert aus *Candida utilis*) der Fa. Serva gegeben.

Die Analysen zur Harnstoffspaltung mit allen unter a bis d genannten Präparaten aus *Torulopsis utilis* verliefen negativ. In keinem der Ansätze wurde eine meßbare Ammoniak-Freisetzung aus dem Harnstoffsubstrat festgestellt.

Andererseits war das hochgereinigte käufliche Ureasepräparat trotz des Zusatzes von Acetonpulver-Extrakt aus *Torulopsis* (Versuchsserie e) voll wirksam.

Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang die nega-

tiv verlaufenen Versuche zum Ureasenachweis mit H_2S -Begasung.

Nach E. MÜLLER (1961) ist eine Infiltration der Zellen mit H_2S für die Erhaltung der Urease-Aktivität besonders günstig. Es wird damit ein sehr wirksamer Ureaseprotektor in die Zellen gebracht, bevor diese zerstört werden. H_2S inaktiviert nicht nur alle schwermetallhaltigen Oxydasen, sondern beseitigt alle SH-reaktiven Gruppen. Außerdem wird bei passender Dosierung der H_2S -Begasung ein mild reduzierendes, für die Urease optimales Redox-Milieu geschaffen. Eine wesentliche pH-Verschiebung wird durch die Infiltration nicht ausgelöst.

In den Versuchen mit *T o r u l o p s i s* wurde dementsprechend sorgfältig gearbeitet. Die Zellsuspensionen wurden vor dem Homogenisieren auf eine Temperatur von ca. $+4^\circ\text{C}$ gebracht und diese auch während der folgenden Arbeitsgänge bis zum Beginn des Ureasenachweises möglichst nicht überschritten (Gefäße mit Kältemischungen, im Tiefkühlschrank vorgekühlte Arbeitsgeräte).

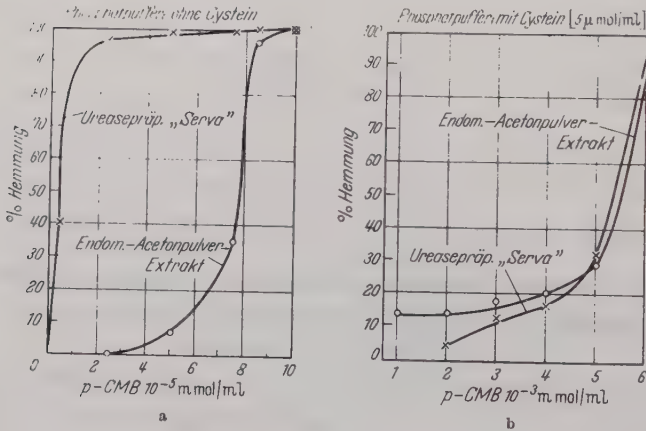
4. Der Einfluß von p-Chlormercuribenzoat und verschiedener Harnstoffderivate auf die Urease-Aktivität in E n d o - m y c o p s i s v e r n a l i s

Die folgenden Untersuchungen wurden zur näheren Charakterisierung und zur Spezifität der Ureasewirkung bei *E n d o m y c o p s i s* durchgeführt.

a) Der Einfluß von p-Chlormercuribenzoat (p-CMB)

Versuchsansatz: Der Einfluß von p-CMB auf die Hemmung der Urease-Aktivität wurde im Phosphat-Puffer vom pH-Wert 6,7 und im Tris-SO_4 -Puffer vom pH-Wert 8,0 geprüft. Als Enzymquellen dienten *E n d o m y c o p s i s*-Acetonpulver-Extrakt und das Ureasepräparat (Fa. Serva). Die Analysen wurden ohne und mit Cystein-Zusatz ($6 \mu\text{mol/ml}$) durchgeführt. In den Versuchsreihen mit Cystein wurden steigende p-CMB-Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-3}$ bis $6 \cdot 10^{-3}$ mmol/ml und in denjenigen ohne Cystein von $1 \cdot 10^{-5}$ bis $1 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml zugesetzt.

Die Ergebnisse der Harnstoffspaltung unter dem Einfluß von p-CMB im Phosphat-Puffer sind in den Abbildungen 4a und 4b graphisch dargestellt worden. Die Hemmung der Ureasewirksamkeit im Acetonpulver-Extrakt von *Endomycopsis* beträgt im Ansatz ohne Cystein-Zusatz (Abb.4a) bei $7,6 \cdot 10^{-5}$ mmol p-CMB/ml ca. 35% gegenüber der Kontrolle ohne p-CMB. Bei einer Konzentration von $8,4 \cdot 10^{-5}$ mmol p-CMB/ml ist die Enzymaktivität zu 96% und bei $1 \cdot 10^{-4}$ mmol/ml ist sie vollständig gehemmt.



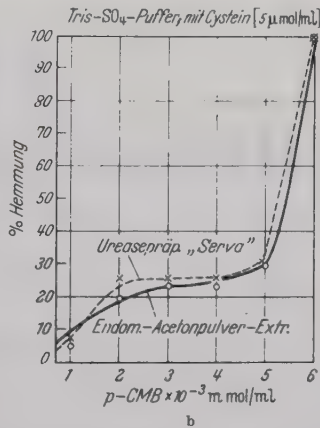
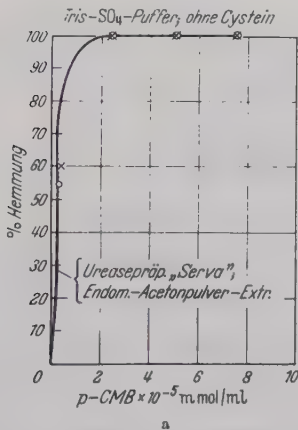
Abbildungen 4a und 4b: Einfluß von p-Chlormercuribenzoat (p-CMB) auf die Urease-Aktivität im Phosphat-Puffer-Medium vom pH-Wert 6,7. Hemmkurven a) ohne Cystein-Zusatz; b) mit Cystein-Zusatz (5 µmol/ml).

o — o *Endomycopsis*-Acetonpulver-Extrakt;
x — x Ureasepräparat (Fa. Serva): 7000 Sumner-E/mg.

Die Harnstoffspaltung durch das hochgereinigte Ureasepräparat wird durch p-CMB ungleich stärker gehemmt: Bei $5 \cdot 10^{-6}$ mmol p-CMB/ml zu 40% und bei $2,5 \cdot 10^{-5}$ mmol/ml bereits zu 97%.

Anders liegen die Verhältnisse, wenn zu den gleichen Ansätzen Cystein ($5 \mu\text{mol/ml}$) zugesetzt wird (Abb.4b). Eine Hemmkurve läßt sich jetzt erst bei p-CMB-Konzentrationen aufstellen, die um zwei Zehnerpotenzen höher liegen als im Ansatz ohne Cystein. Die Hemmkurven für den Acetonpulver-Extrakt und für das Ureasepräparat decken sich fast.

Im Tris- SO_4 -Puffer zeigt die Hemmkurve in den Ansätzen mit Cystein (Abb.5b) etwa den gleichen Verlauf wie die in den Ansätzen mit Cystein im Phosphat-Puffer-Medium (Abb.4b). Auch hier übt die Aminosäure eine Protektorwirkung bei der Urease aus. Im Tris- SO_4 -Puffer-Medium ohne Cystein (Abb.5a) jedoch liegt keine Protektorwirkung vor. Sowohl die Hemmkurve der Urease im Acetonpulver-Extrakt als auch die des Urease-



Abbildungen 5a und 5b: Der Einfluß von p-Chlormercuribenzoat (p-CMB) auf die Urease-Aktivität im Tris- SO_4 -Puffer vom pH-Wert 8,0. Hemmkurven a) ohne Cystein-Zusatz; b) mit Cystein-Zusatz ($5 \mu\text{mol/ml}$).

o — o Endomycopsis-Acetonpulver-Extrakt;
x — x Ureasepräparat (Fa. Serva): 7000 Sumner-E/mg.

präparates steigt durch geringe p-CMB-Konzentration sofort auf fast 100% an.

Die Ergebnisse der Versuche, die in den Abbildungen 4a,b und 5a,b dargestellt worden sind, lassen sich folgendermaßen interpretieren: Im Phosphat-Puffer-Medium ist die Urease des Acetonpulver-Extraktes durch Protektoren, die sich offenbar im Extrakt befinden, gegen die Hemmung von p-CMB über einen gewissen Konzentrationsbereich des Inhibitors hinweg geschützt. Das hochgereinigte Ureasepräparat ist frei von diesen Protektoren (Abb.4a). Die Hemmung der Urease-Aktivität setzt hier sofort stark ein. Im Tris-SO₄-Puffer kommen die im Acetonpulver-Extrakt vorhandenen Protektoren hingegen nicht zur Wirkung (Abb.5a). Die Hemmkurven für das Ureasepräparat und für die Urease des Acetonpulver-Extraktes entsprechen hier etwa dem Verlauf der Kurve für die "Serva"-Urease im Phosphat-Puffer-Medium (Abb.4a).- 5 µmol Cystein in 1 ml Reaktionslösung schützen sowohl im Phosphat-Puffer- (Abb.4b) als auch im Tris-Puffer-Medium (Abb.5b) das Ureasepräparat und die Urease im Acetonpulver-Extrakt von *Endomycopsis* vor der p-CMB-Hemmung, bis die Konzentration des Inhibitors $5 \cdot 10^{-3}$ bis $6 \cdot 10^{-3}$ mmol/ml erreicht. In diesem Zusammenhang sei auf die Befunde von M.C. WALL u. K.I. LAIDLER (1953), daß Kalium- und Natriumionen die Urease-Aktivität hemmen, Phosphationen hingegen fördernd wirken, hingewiesen.

b) Der Einfluß verschiedener Harnstoffderivate auf die Urease-Aktivität von *Endomycopsis vernalis*

Zur weiteren Charakterisierung der *Endomycopsis*-Urease wurde der Einfluß verschiedener Harnstoffderivate auf

die Harnstoffspaltung des Acetonpulver-Extraktes im Tris-SO₄-Puffer vom pH-Wert 8,0 geprüft. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind in Tab.6 zusammengefaßt worden. In gleicher Weise wurden auch Versuche mit dem Ureasepräparat der Fa. Serva durchgeführt.

Thioharnstoff (p.a., Fa. Merck) zeigt bis zu einer Konzentration von 40 µmol/ml keinen Hemmeffekt auf die Harnstoffspaltung durch den E n d o m y c o p s i s-Acetonpulver-Extrakt und das Ureasepräparat (Fa. Serva). Zu ähnlichen Ergebnissen sind auch G.B. KISTIAKOWSKY u. W.H.R. SHAW (1953) gekommen. Sie fanden, daß beim pH-Wert 7,0 50 µmol Thioharnstoff/ml keinen Effekt auf die Urease-Aktivität haben, aber bei einer Konzentration von 500 µmol eine Hemmung der Urease-Aktivität von 35% gegenüber der Kontrolle eintritt.

Tabelle 6: Der Einfluß verschiedener Harnstoffderivate auf die spezifische Urease-Aktivität im Acetonpulver-Extrakt von E n d o m y c o p s i s und das gereinigte Ureasepräparat (Fa. Serva)

Harnstoffderivate	Keine Hemmwirkung	Hemmwirkung	
	Konzentration in µmol/ml	Konzentration in µmol/ml	Hemmung in %
Thioharnstoff	40		
Äthylharnstoff	150		
Methylharnstoff	80		
Biuret	80		
Phenylharnstoff		20	34
Phenylharnstoff		40	56

Äthylharnstoff (Fa. Fluka) hemmt bis zu einer Konzentration von 150 µmol/ml weder die Urease im Acetonpulver-Extrakt von E n d o m y c o p s i s noch die Wirksamkeit des hochgereinig-

ten Ureasepräparates.

Methylharnstoff (Fa. Koch-Light) hemmt in einer Konzentration von 80 $\mu\text{mol/ml}$ nicht die Urease-Aktivität in den verwandten Präparaten.

Biuret (Fa. Schuchardt) wurde zunächst zur Reinigung in Wasser und dann in Äthanol umkristallisiert. Eine Konzentration bis zu 80 $\mu\text{mol/ml}$ bewirkt keine Hemmung der Urease.

Phenylharnstoff (Fa. Koch-Light) hemmt in einer Konzentration von 20 $\mu\text{mol/ml}$ die Urease in beiden Versuchsreihen um 34%, bei 40 $\mu\text{mol/ml}$ bereits um 56%.— Ein Kontrollversuch mit Phenylalanin (40 $\mu\text{mol/ml}$) zeigte eine Hemmung der Urease-Aktivität um 73%.

Die Ergebnisse der Versuche zusammenfassend, kann geschlossen werden, daß Thioharnstoff, Äthylharnstoff, Methylharnstoff und Biuret keinen Einfluß auf die Urease-Aktivität des Acetonpulver-Extraktes von *Endomycopsis* und des reinen Ureasepräparates haben. Die Blindwerte mit den Harnstoffderivaten allein ergaben keine signifikante Freisetzung von Ammoniak.

Hingegen tritt bei Verwendung von Phenylharnstoff ein deutlicher Hemmeffekt auf. Dieser ist aber wahrscheinlich, wie der Kontrollversuch mit Phenylalanin zeigt, auf den aromatischen Kern des Phenylharnstoffs zurückzuführen [vgl. hiermit auch den Versuch mit Phenylharnstoff als N-Quelle für *Endomycopsis* (s. Abb.35 S.78), in dem die Urease-Aktivität im Acetonpulver-Extrakt stark gehemmt ist].

Es sei darauf hingewiesen, daß W.N. FISHBELN u. Mitarb. (1965) sowie W.N. FISHBELN u. P.P. CARBONE (1965) durch ein kristal-

lines Ureasepräparat aus *C a n a v a l i a e n s i f o r -*
m i s eine Spaltung von Hydroxyharnstoff zu Hydroxylamin,
Ammoniak und Kohlendioxyd erhalten haben; Hydroxyharnstoff
hemmte die Urease-Aktivität.

5. Diskussion der bisherigen Ergebnisse

M. STEINER u. H. KATING (1957, 1961) und H. KATING (1962b)
haben berichtet, daß *T o r u l o p s i s u t i l i s* urease-
frei ist. Da aber diese Hefe auf Harnstoff als alleiniger
N-Quelle gut zu wachsen vermag, haben sie bei diesem Organis-
mus auf eine Harnstoffnutzung ohne vorhergehende Ammoniak-
freisetzung aus dieser Verbindung geschlossen. E. MÜLLER (1961)
hat hingegen in *T a r a x a c u m o f f i c i n a l e* eine
gehemmte Urease gefunden und vermutet, daß auch in anderen Or-
ganismen, bei denen eine Harnstoffnutzung ohne Ureasewirkung
angenommen wird, nur eine verzögerte Harnstoffspaltung vorlie-
gen könnte. Hierauf deuten auch die Ergebnisse der Arbeitsgrup-
pe von I. REIFER hin, die bei *P o p u l u s b e r o l i n e n -*
s i s und in Salatsamen einen Ureasehemmstoff gefunden hat
(I. REIFER u. G. MORAWSKA, 1963; I. REIFER u. B. WIELGAT, 1964;
M. DABROWSKA u. Mitarb. 1966).

Die vorliegenden Untersuchungen haben die Befunde von M. STEI-
NER u. H. KATING, daß *T o r u l o p s i s u t i l i s* urease-
frei ist, bestätigt. Alle durchgeführten Versuche, bei *T o r u -*
l o p s i s in Extrakten aus frischen Zellen, Acetonpulver-
Extrakten (unter Zusatz verschiedener organischer SH-Gruppen-
Protektoren und mit H_2S -Begasung) und in durch Säulentrennung
an Sephadex gereinigten Fraktionen des Acetonpulver-Extraktes
eine Urease nachzuweisen, verliefen negativ. Die Befunde von

H. KATING (1962b), daß der Harnstoff durch *T o r u l o p s i s* *u t i l i s* in einen Carbamylrest und in eine NH_2 -Gruppe gespalten wird und beide Spaltprodukte ohne Freisetzung direkt zur Synthese von Citrullin und Glutaminsäure transferiert werden, gewinnen hiermit an Wahrscheinlichkeit.

Parallel zu diesen Untersuchungen war es von Interesse, die Eigenschaften der stark wirksamen Urease in *E n d o m y c o p s i s* *v e r n a l i s* näher zu charakterisieren. Es zeigte sich, daß die Urease-Aktivität dieser Hefe im Tris- SO_4 -Puffer (pH-Wert 8,0) fünf- bis sechsmal höher ist als im Phosphat-Puffer (pH-Wert 6,7). Offensichtlich wirken die Phosphat-Ionen [nach G.D. FASMAN u. C. NIEMANN (1951) vielleicht auch die Alkali-Ionen des Puffers] auf die *E n d o m y c o p s i s*-Urease hemmend. E. MÜLLER (1961) hingegen hat bei *T a r a x a c u m o f f i c i n a l e* keinen Unterschied der Urease-Aktivität im Tris- SO_4 -Puffer und Phosphat-Puffer gefunden. Nach dem unterschiedlichen Verhalten der *E n d o m y c o p s i s*-Urease in den beiden Puffersystemen können zwei verschiedene Ureasen vermutet werden. Eine solche Auslegung wird auch durch die Arbeit von T. NICOLOFF (1957) gestützt. Dieser Autor fand für die Magen-Urease und die Soja-Urease zwei verschiedene pH-Optima, sowie spezifische Inaktivatoren für die Magen-Urease. Er schließt die Identität beider Ureasen aus.

Zur weiteren Charakterisierung der *E n d o m y c o p s i s*-Urease wurde die Hemmung des Enzyms durch p-Chlormercuribenzoat (p-CMB) näher untersucht. Die Urease des Acetonpulver-Extraktes wird im Phosphat-Puffer-Medium, nicht aber im Tris- SO_4 -Puffer, durch natürliche Protektoren gegen die Hemmung

durch p-CMB geschützt. In Parallelversuchen setzte der Hemmeffekt von p-CMB auf die Aktivität eines hochgereinigten Ureasepräparates (Fa. Serva) in beiden Puffersystemen sofort ein. Die Schutzwirkung wird durch Zusatz von L-Cystein verstärkt.

Aus den Versuchen über den Einfluß verschiedener Harnstoffderivate (Thioharnstoff, Äthylharnstoff, Methylharnstoff, Phenylharnstoff und Biuret) auf die Harnstoffspaltung im Acetonpulver-Extrakt ist die Wirkung von Phenylharnstoff von Interesse: Bereits Konzentrationen von 20 $\mu\text{mol/ml}$ hemmen die Urease-Aktivität. Wie der ebenfalls positiv verlaufende Kontrollversuch mit Phenylalanin zeigt, dürfte dieser Hemmeffekt aber auf den aromatischen Kern im Molekül zurückzuführen sein.

II. DIE SPEZIFISCHEN AKTIVITÄTEN DER ENZYME DES ORNITHIN-
CYCLUS BEI E N D O M Y C O P S I S V E R N A L I S
UND T O R U L O P S I S U T I L I S IN ABHÄNGIGKEIT
VON DER N-QUELLE

Harnstoff ist sowohl für *E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s* als auch für *T o r u l o p s i s u t i l i s* eine gute N-Quelle. Beide Organismen verarbeiten ihn aber auf verschiedenen Wegen (mit bzw. ohne Ureasewirksamkeit). Von Interesse schien es deshalb zu sein, in diesen beiden Hefen die Synthese des Harnstoffs über den Ornithin-Cyclus näher zu untersuchen, zumal der vollständige Ablauf dieses Kreisprozesses in Mikroorganismen und höheren Pflanzen erst vor kurzer Zeit nachgewiesen worden ist (s. u.a. H. KATING, 1962a,b; 1963). Der Cyclus dient bei diesen nicht wie in den Säugetierorganismen im wesentlichen zur Ammoniakentgiftung, sondern hat eine Funktion bei der Stickstoffassimilation und spielt offenbar eine bedeutende Rolle im Stoffwechsel der freien N-Verbindungen. Über die spezifischen Aktivitäten und möglichen Regulationsmechanismen der Enzyme des Ornithin-Cyclus liegen für Mikroorganismen nur wenige Befunde vor (s. Diskussion S. 40 ff und S. 81 ff). Ziel der Untersuchungen war es deshalb, die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Kreisprozesses in Abhängigkeit von den gebotenen N-Quellen zu untersuchen. Es lag nahe, zunächst den Einfluß von Ammonium, Harnstoff, Asparagin und den Aminosäuren des Ornithin-Cyclus zu prüfen.

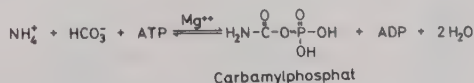
1. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus
von Endomycopsis und Torulopsis nach
Kultur auf verschiedenen N-Quellen

Versuchsansätze: Beide Hefen wurden in mehreren Versuchsreihen auf einer Wöltje-Nährlösung angezogen, in der jeweils die N-Quelle Asparagin (1%) durch N-äquivalente Mengen Harnstoff, Ammoniumsuccinat, L-Arginin, L-Citrullin bzw. L-Ornithin ersetzt worden war. Nach 3 1/2 Tagen wurde das Pilzmaterial geerntet und zu Acetontrockenpulver verarbeitet. Im Acetonpulver-Extrakt wurden in jeweils zwei parallelen Versuchsansätzen die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus bestimmt.

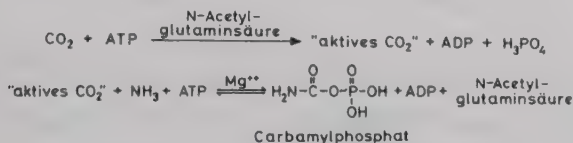
a) Carbamoylphosphat-synthetase

Für die folgenden Untersuchungen ist es von Bedeutung, daß das am Anfang des Ornithin-Cyclus stehende Carbamylphosphat auf drei verschiedenen Wegen gebildet werden kann:

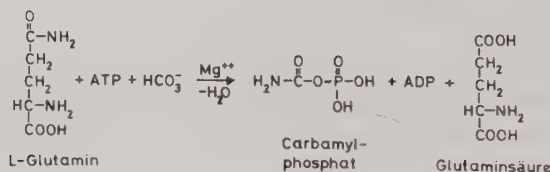
1. Vorwiegend in Bakterien wird die Synthese nach folgender Reaktion durch das Enzym Carbamat-kinase katalysiert. Hierbei bildet sich aus HCO_3^- und NH_4^+ zunächst Carbamat, das dann mit ATP (und Mg^{++} als Cofaktor) enzymatisch zu Carbamylphosphat reagiert (vgl. M.E. JONES u. Mitarb., 1955; L.C. MOKRASCH u. Mitarb., 1960; J.M. RAVEL u. Mitarb., 1961).



2. Vornehmlich im tierischen Organismus, aber auch in höheren Pflanzen, ist der durch die Carbamoylphosphat-synthetase katalysierte zweite Syntheseweg gefunden worden (vgl. R.L. METZENBERG u. Mitarb., 1958; G.W. BROWN u. P.P. COHEN, 1959). Die Synthese verläuft in zwei Stufen: Im ersten Reaktionsschritt verbindet sich 1 Mol ATP mit CO_2 und dem spezifischen Katalysator N-Acetylglutaminsäure zu "aktivem CO_2 ", das im zweiten Schritt mit Ammoniak und einem weiteren Mol ATP in Anwesenheit von Mg^{++} -Ionen Carbamylphosphat bildet.



3. Die Carbamoylphosphat-synthetase katalysiert auch die Bildung von Carbamylphosphat auf einem zweiten Wege. Als N-Donator wird dabei L-Glutamin benötigt. Dieser Biosyntheseweg wurde in Mikroorganismen und höheren Pflanzen gefunden. Er läuft in Gegenwart von ATP, Bicarbonat und Mg^{++} -Ionen nach folgender Reaktion ab, wobei die Amidgruppe des L-Glutamins



als N-Donator dient (vgl. B. LEVENBERG, 1962; K. KLECZKOWSKI, 1965; F. LACROUTE u. Mitarb., 1965; U. HIORT u. Mitarb., 1967).

In Vorversuchen zur Carbamylphosphat-Synthese bei *Endomycopsis* und *Torulopsis* (Kultur auf Harnstoffmedium) wurde gefunden, daß für beide Versuchsorganismen L-Glutamin der beste N-Donator war (Tab.7). Mit Ammoniumsulfat

Tabelle 7: Einfluß der N-Donatoren L-Glutamin und Ammoniumsulfat auf die Carbamylphosphat-Synthese bei *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis*

N-Quelle in der Nährlösung	Spez. Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase in μmol Citrullin/mg Eiweiß/60 Min./37°C			
	Endomycopsis		Torulopsis	
	N-Donator		N-Donator	
	L-Glutamin	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	L-Glutamin	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Harnstoff	0,150	0,030	0,020	0,005
Harnstoff	0,160	0,040	0,050	0,010

wurden nur rund 20% der mit Glutamin gefundenen Aktivität gemessen. N-Acetylglutaminsäure zeigte keinen signifikanten Einfluß auf die Synthese von Carbamylphosphat. Nach den Ergebnissen dieser Versuchsreihen wurde L-Glutamin für die weiteren Untersuchungen zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase verwendet.

In Abb.6 (3. Säulengruppe) sind die spezifischen Aktivitäten der Carbamoylphosphat-synthetase (gemessen in $\mu\text{mol Citrullin/mg Eiweiß}$) nach Anzucht von *Endomycopsis* auf verschiedenen N-Quellen und in Abb.7 (3. Säulengruppe) entsprechend für *Torulopsis* wiedergegeben worden (N-Donator jeweils L-Glutamin). Die höchste spezifische Aktivität (0,16) dieses Enzyms wurde bei *Endomycopsis* nach Wachstum auf Harnstoff als N-Quelle gefunden. Bei Anzucht auf L-Asparagin sank die spezifische Aktivität auf rund 50% und bei den N-Quellen Ammoniumsuccinat und L-Arginin auf 12 - 20% gegenüber dem erstgenannten Ansatz. Bei L-Ornithin und L-Citrullin als jeweilige N-Quellen in der Nährlösung wurden nur Spuren oder keine Enzymaktivität gefunden.

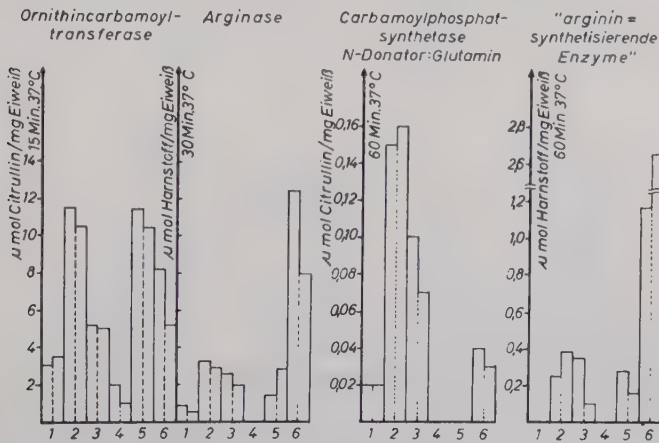
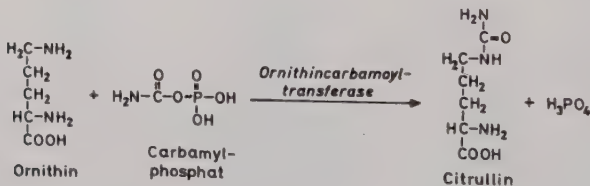


Abbildung 6: Der Einfluß verschiedener N-Quellen des Kulturmediums auf die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus im Acetonpulver-Extrakt von *Endomycopsis vernalis*. N-Quellen: 1 Ammoniumsuccinat 4 L-Ornithin
2 Harnstoff 5 L-Citrullin
3 L-Asparagin 6 L-Arginin

Ein wesentlich anderer Einfluß der N-Quellen auf die spezifische Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase wurde in den Acetonpulver-Extrakten der *T o r u l o p s i s*-Kulturen gefunden. Nur nach Wachstum auf Ammoniumsuccinat, Harnstoff und L-Asparagin als jeweils alleinige N-Quelle wurden meßbare Aktivitäten gefunden. Diese betragen rund 30% der bei *E n d o m y c o p s i s* gefundenen höchsten spezifischen Aktivität (s. Harnstoff als N-Quelle). Offenbar unterdrücken bei *T o r u l o p s i s* die Aminosäuren des Ornithin-Cyclus die Synthese der Carbamoylphosphat-synthetase^{*)}.

b) Ornithincarbamoyl-transferase

Das durch die Carbamoylphosphat-synthetase entstandene Carbamoylphosphat wird durch das Enzym Ornithincarbamoyl-transferase auf Ornithin unter Bildung von Citrullin transferiert (s. u.a. M.E. JONES u. Mitarb., 1955; K. KLECZKOWSKI, 1957; G. REUTER, 1959; G.W. BROWN u. P.P. COHEN, 1959; I. REIFER u. K. KLECZKOWSKI, 1960). Bei dieser Enzymreaktion wird neben Citrullin noch anorganisches Phosphat gebildet:



Die höchsten spezifischen Aktivitäten dieses Enzyms wurden bei *E n d o m y c o p s i s* (Abb.6; 1. Säulengruppe) nach Kultur auf Harnstoff und L-Citrullin (etwa 11,0) gefunden. Bei L-Arginin (spezifische Aktivität etwa 6,5), L-Asparagin (etwa 5,0),

^{*)} Es sei erwähnt, daß in einigen Ansätzen bei den N-Quellen L-Ornithin und L-Citrullin geringe, aber nicht sicher meßbare Aktivitäten unter den angegebenen Versuchsbedingungen gefunden wurden.

Ammoniumsuccinat (etwa 3,3) oder L-Ornithin (etwa 1,5) als jeweils alleinige N-Quelle sind die Enzymaktivitäten deutlich geringer.

In den Parallelversuchen mit *Torulopsis* (Abb.7; 1. Säulengruppe) schwanken die spezifischen Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der N-Quelle nicht so stark wie bei *Endomyces*. Lediglich nach Wachstum auf L-Citrullin und Harnstoff liegt mit 8,5 und 7,0 eine relativ hohe spezifische Aktivität vor. Bei den anderen N-Quellen liegt sie bei etwa 5,0. Hervorzuheben ist noch, daß die auf Ammoniumsuccinat und auf L-Ornithin gewachsenen *Torulopsis*-Zellen bedeutend höhere spezifische Aktivitäten der Ornithincarbamoyl-

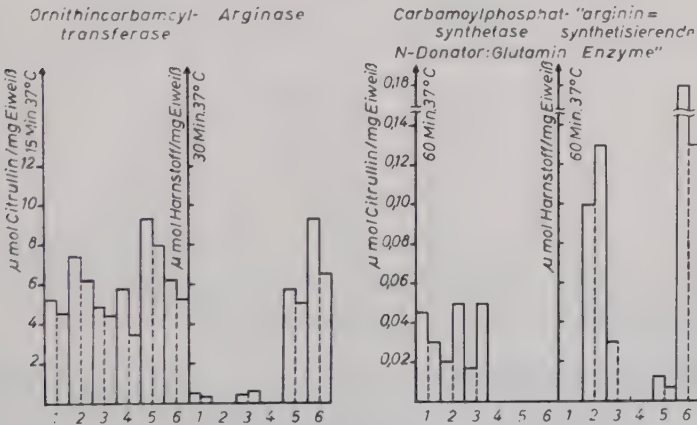
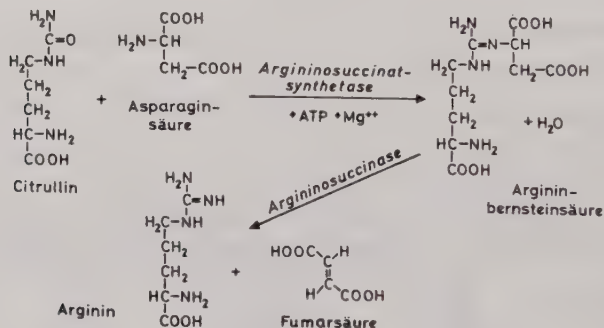


Abbildung 7: Der Einfluß verschiedener N-Quellen des Kulturmediums auf die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus im Acetonpulver-Extrakt von *Torulopsis utilis*. N-Quellen: 1 Ammoniumsuccinat 4 L-Ornithin
 2 Harnstoff 5 L-Citrullin
 3 L-Asparagin 6 L-Arginin

transferase haben als die *Endomycopsis*-Zellen.

c) "Argininsynthetisierende Enzyme"

Die Argininsynthese aus Citrullin verläuft über Argininbernsteinsäure als Intermediärverbindung (s. u.a. S. RATNER u. B. PETRACK, 1951; J.B. WALKER, 1952; D.C. DAVISON u. W.H. ELLIOTT, 1952; S. BURACZEWSKI u. Mitarb., 1960). An diesem als "RATNER-Reaktion" bezeichneten Zweistufenprozeß sind zwei Enzyme beteiligt. Zunächst wird Argininbernsteinsäure durch die Argininosuccinat-synthetase in Gegenwart von ATP, Asparaginsäure und Mg^{++} -Ionen katalysiert. Im folgenden Reaktionsschritt wird die Argininbernsteinsäure durch die Argininosuccinase in Arginin und Fumarsäure gespalten.



Die spezifischen Aktivitäten beider Enzyme werden zusammen in einem Nachweis bestimmt (s. Methodenteil S. 13).

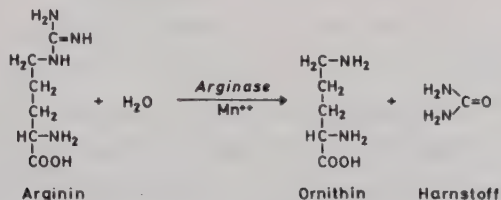
Im Acetonpulver-Extrakt von *Endomycopsis* (s. Abb.6; 4. Säulengruppe) ist die spezifische Aktivität dieser Enzyme nach Kultur des Versuchsorganismus auf L-Arginin mit 1,16 bzw. 2,65 gegenüber den auf Harnstoff, L-Asparagin oder L-Citrullin gewachsenen Zellen (0,2 bis 0,3) sehr hoch. Bei Ammoniumsuccinat und L-Ornithin als N-Quellen konnte keine Aktivität der

"argininsynthetisierenden Enzyme" gefunden werden.

Bei *Torulopsis* (Abb.7; 4. Säulengruppe) liegen, wenn der Einfluß der verschiedenen N-Quellen verglichen wird, grundsätzlich die gleichen Verhältnisse vor: Eine hohe spezifische Aktivität nach Wachstum auf L-Arginin und Harnstoff (!); eine geringere bei L-Asparagin und L-Citrullin und keine Aktivität bei Kultur auf Ammoniumsuccinat und L-Ornithin. Ein wesentlicher Unterschied zu den *Endomycopsis*-Ansätzen besteht darin, daß die spezifische Aktivität dieser Enzyme bei *Endomycopsis* erheblich höher ist (s. die in Abb.6 aufgetragenen größeren Maßeinheiten).

d) Arginase

Im letzten Schritt des Ornithin-Cyclus spaltet die Arginase Harnstoff hydrolytisch aus Arginin unter katalytischer Wirkung von Mn^{++} -Ionen ab (s. u.a. D.M. GREENBERG, 1955; S.J. BACH u. J.D. KILLIP, 1958). Es resultiert weiterhin Ornithin, das wiederum zur Reaktion mit Carbamylphosphat zur Verfügung steht:



Bei beiden Versuchsorganismen ist die Arginase-Aktivität (Abb.6 und 7; 2. Säulengruppe) in den Zellen, die auf L-Arginin als N-Quelle kultiviert worden waren, am stärksten gefördert (spezifische Aktivität bei *Endomycopsis* etwa 10,0 und bei *Torulopsis* etwa 8,0).

Das Wachstum von *Endomyces* auf jeweils Ammonium-succinat, Harnstoff, L-Asparagin oder L-Citrullin bewirkt wesentlich geringere spezifische Aktivitäten (zwischen 1,0 und 3,0). Bei L-Ornithin als N-Quelle ist bei *Endomyces* keine Aktivität gemessen worden.

Ähnlich liegen für die letztgenannten N-Quellen die Verhältnisse im Acetonpulver-Extrakt von *Torulopsis*. Harnstoff und Ornithin hemmen als N-Quellen im Nährmedium nach den angewandten Analysemethoden die Arginase-Aktivität vollständig. Bei Wachstum auf Ammoniumsuccinat und L-Asparagin ist die spezifische Aktivität der Arginase sehr gering^{*)}.

2. Diskussion der bisherigen Ergebnisse über die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus

Aus genetischen Untersuchungen an Mikroorganismen ist bekannt, daß die auf dem gleichen Biosyntheseweg entstehenden Verbindungen gleichzeitig einen Kontrollmechanismus für die Bildungskette darstellen. Drei verschiedene Kontrollmechanismen werden beschrieben (s. u.a. W.K. MAAS u. E. McFALL, 1964):

1. Kontrolle der Enzymsynthese durch "Endprodukthemmung" (feed-back inhibition); 2. Enzymrepression; 3. Enzyminduktion (über die sprunghafte Änderung der spezifischen Aktivität in verschiedenen Mikroorganismen siehe auch W.D. DONACHIE, 1964).- Im folgenden wird versucht, die Ergebnisse über die Abhängigkeit der Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus von ver-

^{*)} Eine Bemerkung sei noch zu folgendem Literaturbefund gegeben: J. ROCHE u. G. LACOMBE (1952) meldeten in Bäckerhefe das Fehlen der Arginase-, aber das Vorhandensein einer hohen Arginindesiminase-Aktivität. Eigene Untersuchungen mit *Endomyces* und *Torulopsis* ergaben dagegen eine hohe Arginase-Aktivität (bis 12,5 μ mol Harnstoff/mg Eiweiß) und nur Spuren von Arginindesiminase-Aktivität in Acetonpulver-Extrakten.

schiedenen N-Quellen bei *E n d o m y c o p s i s* und *T o r u l o p s i s* im Hinblick auf die obengenannten Kontrollmechanismen zu interpretieren.

A s p a r a g i n und A m m o n i u m s u c c i n a t: Bei der Anzucht der beiden Hefen auf Asparagin als N-Quelle tritt kein signifikanter Einfluß auf die Bildung der Enzyme des Ornithin-Cyclus auf. Wird Ammoniumsuccinat als Substrat geboten, so fällt auf, daß die "argininsynthetisierenden Enzyme" vollständig gehemmt sind. Eine Erklärung hierfür kann zur Zeit nicht gegeben werden.

H a r n s t o f f: Wächst *T o r u l o p s i s* auf Harnstoff als alleiniger N-Quelle auf, so ist keine Arginase-Aktivität nachzuweisen (bei den Aminosäuren des Ornithin-Cyclus sind unterschiedliche spezifische Aktivitäten gefunden worden). Das Fehlen der Arginase-Aktivität in *T o r u l o p s i s* nach Kultur auf Harnstoff kann als eine Repression der Enzyymbildung durch "Endprodukthemmung" aufgefaßt werden (s. auch L. GORINI, 1963). Bei *E n d o m y c o p s i s* hingegen ist die Arginase-Aktivität durch Harnstoff nicht unterbunden. Diese Tatsache, daß Harnstoff bei *E n d o m y c o p s i s* nicht in gleicher Weise wie bei *T o r u l o p s i s* die Arginasesynthese hemmt, findet wohl dadurch ihre Erklärung, daß *E n d o m y c o p s i s* eine stark wirksame Urease besitzt, so daß nicht wie bei der ureasefreien *T o r u l o p s i s* Harnstoff als Endprodukt der Arginasewirksamkeit kumuliert wird.

L - O r n i t h i n: Diese Aminosäure übt den stärksten Hemmeffekt auf die Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus aus.

Mit Ausnahme der Ornithincarbamoyl-transferase - siehe auch L. GORINI (1960) bei *E s c h e r i c h i a / c o l i* - scheinen alle anderen Enzyme vollständig gehemmt zu sein. Bei *E n d o m y c o p s i s* ist zusätzlich eine deutliche Verminderung der spezifischen Aktivität der Ornithincarbamoyl-transferase vorhanden. In der Literatur findet sich keine Erklärung für diesen Hemmeffekt. Hinsichtlich der Hemmung der Carbamoylphosphat-synthetase bei *T o r u l o p s i s* muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß dieser ureasefreie Organismus wahrscheinlich noch einen anderen Weg der Bildung von Carbamylphosphat besitzt (Spaltung von Harnstoff in einen Carbamylrest und eine NH_2 -Gruppe, wobei beide Gruppen transferiert werden (H. KATING, 1962b)). In diesem Zusammenhang seien auch die Vorstellungen von A.R. COOK u. D. BOULTER (1964) über den Harnstoffabbau von *C a n d i d a f l a r e r i* erwähnt. Bei diesem Organismus soll sich der Harnstoff mit einem Zweikohlenstoffkörper zu Hydantoinsäure verbinden, die dann in Carbamylphosphat (!) und Glycin aufspaltet.

C i t r u l l i n: Hinsichtlich der Citrullinwirkung sind zwei Fälle hervorzuheben: So wie Arginin die Arginase und die beiden "argininsynthetisierenden Enzyme" induziert (siehe weiter unten), kontrolliert Citrullin bei beiden Versuchsorganismen als Endprodukt die Ornithincarbamoyl-transferase-Synthese im Sinne einer Induktion. Arginin als Endprodukt der Wirkung der "argininsynthetisierenden Enzyme" ist ein besserer Förderer für ihre Synthese als es Citrullin als Substrat für diese Enzyme ist.

A r g i n i n: Von A.M. SRB u. N.N. HOROWITZ (1944) wird

Arginin als ein Induktor bei der Arginasebildung in *Neurospora crassa* beschrieben. Auch bei *Endomycopsis* und *Torulopsis* wird die Arginasesynthese durch das Substrat stark gefördert.

Über die Wirkung von Arginin auf die spezifische Aktivität bzw. über die Synthese anderer Enzyme des Ornithin-Cyclus liegen verschiedene Befunde vor: L. GORINI u. Mitarb. (1961), L. GORINI (1963) und R.T. SCHIMKE (1962, 1964) beschreiben Arginin als Inhibitor für die "argininsynthetisierenden Enzyme" (Argininosuccinat-synthetase und Argininosuccinase) in verschiedenen Mikroorganismen (siehe auch S. UDAKA, 1966). Nach R.H. DAVIS (1964) hemmt Arginin die Synthese der Carbamoylphosphat-synthetase in *Neurospora crassa* (arg-3-Mutanten). - Die mit *Endomycopsis* und *Torulopsis* gefundenen Ergebnisse, betreffend die Argininwirkung auf die Aktivitäten der obengenannten Enzyme des Ornithin-Cyclus, bestätigen die Befunde anderer Autoren nur hinsichtlich der Carbamoylphosphat-synthetase bei *Torulopsis*. Bei diesem Organismus unterdrückt Arginin offenbar die Synthese dieses Enzyms. Im Acetonpulver-Extrakt von *Endomycopsis* hingegen wurde eine gerade noch meßbare Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase gefunden. Eine Erklärung liegt möglicherweise darin, daß die Arginase-Aktivität bei *Endomycopsis* allgemein höher als bei *Torulopsis* ist. Dadurch wird die Argininkonzentration im Kulturmedium von *Endomycopsis* stärker als bei *Torulopsis* herabgesetzt und die Hemmwirkung auf die Carbamoylphosphat-Synthese damit vermindert.

Die hier vorgelegten Befunde lassen sich im Zusammenhang mit den Angaben aus der Literatur dahingehend zusammenfassen, daß die Kontrollmechanismen für bestimmte Enzymreaktionen in verschiedenen Organismen verschiedener Art sein können.

Eine Prüfung der N-Donatoren für die Carbamylphosphat-Synthese ergab, daß L-Glutamin höhere Synthesewerte lieferte als Ammoniumsulfat. Auch bei Bakterien (*M i c r o c o c c u s d e n i t r i f i c a n s*) fanden U. HIORT u. Mitarb. (1967) besonders in jungen Kulturen höhere spezifische Aktivitäten, wenn L-Glutamin als N-Donator beim Nachweis der Carbamylphosphat-Synthese verwendet wurde. Die gleichen Ergebnisse haben erstmals für höhere Pilze (*A g a r i c u s b i s p o r u s*) B. LEVENBERG (1962), für höhere Pflanzen (Erbsenkeimlinge) K. KLECZKOWSKI (1965) und für andere Hefestämme F. LACROUTE u. Mitarb. (1965) gefunden. A. PIÉRARD u. Mitarb. (1965) schlagen für dieses Enzym den provisorischen Namen "Glutamino-carbamoylphosphat-synthetase" vor.

III. DIE SPEZIFISCHEN AKTIVITÄTEN DER ENZYME DES ORNITHIN-
CYCLUS BEI UMPFLANZKULTUREN VON E N D O M Y C O P S I S
V E R N A L I S UND T O R U L O P S I S U T I L I S I N
ABHÄNGIGKEIT VON DER KULTURDAUER

1. Vorversuche zu den Umpflanzkulturen

a) Unterschiedliche spezifische Aktivitäten der Enzyme bei
N-armer und N-reicher Kultur

Die im vorstehenden Abschnitt beschriebenen Versuche hatten gezeigt, daß bei beiden Organismen zu einem bestimmten Erntezeitpunkt die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus in unterschiedlicher Weise durch das Wachstum auf verschiedenen N-Quellen beeinflusst sind. Es sollte weiterhin geprüft werden, in welcher Weise sich im Verlaufe der Kulturdauer die Enzymaktivitäten ändern. Um hierbei den Einfluß der N-Quelle deutlicher zu fassen, sollten die Versuchsorganismen zunächst auf einer Nährlösung mit wenig Asparagin als N-Quelle (N-Hunger!) vorkultiviert und dann die vorgezogene Pilzdecke auf ein Nährmedium mit der zu prüfenden neuen N-Quelle umgepflanzt werden. Es ist dabei zu erwarten, daß die N-arm vorgezogenen Kulturen bei ihrem Angriff auf die neue N-Quelle Änderungen in den spezifischen Enzymaktivitäten stärker als in Aufwuchskulturen (= Animpfung mit wenigen Keimen und langsames Wachstum) hervortreten lassen.

Um den günstigsten Zeitpunkt der Umpflanzung zu ermitteln, wurden zunächst sowohl die Trockengewichte bei N-armer Kultur als auch einige der interessierenden spezifischen Enzymaktivitäten während des Kulturverlaufes bei N-armer und N-reicher Anzucht analysiert.

Versuchsansätze: *Endomycopsis vernalis* wurde auf normaler Wöltje-Nährlösung (mit 1% Asparagin als N-Quelle) und N-arm mit 1/4% Asparagin*) kultiviert. In gleicher Weise wurde *Torulopsis utilis* auf normaler Wöltje-Nährlösung und N-arm mit 1/2% Asparagin*) gezogen. Die Trockengewichte und die spezifischen Enzymaktivitäten wurden nach den in der Tab.8 bzw. in den Abb.8 und 9 angegebenen Zeiten bestimmt.

Tabelle 8: Trockengewichte von *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis* bei N-armer Kultur. Mittelwerte aus jeweils zwei Parallelernten.

Versuchs- organismus und N-Quelle	Trockengewichte pro Kulturschale in mg nach				
	60 Std.	72 Std.	80 Std.	88 Std.	96 Std.
<i>Endomycopsis</i> 1/4% Asparagin	90	131	158	175	183
<i>Torulopsis</i> 1/2% Asparagin	75	132	136	140	145

Die Analysen der Trockengewichtsproduktion bei N-armer Anzucht, die in Tab.8 zusammengefaßt worden sind, zeigen, daß nach 80, spätestens nach 88 Std. Kulturdauer bei beiden Versuchsorganismen kein nennenswerter Zuwachs mehr erfolgt. Offensichtlich ist zu diesem Zeitpunkt die N-Quelle der Nährlösung erschöpft (s. hierzu u.a. S. HEIDE, 1939 und H. KATING, 1955b).

Die Bestimmung einiger Enzymaktivitäten bei *Endomycopsis* unter N-armen und N-reichen Kulturbedingungen (Abb.8) läßt deutlich einen Einfluß des N-Mangels erkennen: Die Ornithin-

*) Nach den Untersuchungen von S. HEIDE (1939) liegt bei 1/4% Asparagin in der Nährlösung für *Endomycopsis* ein deutlicher N-Mangel vor: Die Hefe bildet weniger Eiweiß, während die Kohlenhydrat-Quelle zu einer vermehrten Fettsynthese verwandt wird.- *Torulopsis* hingegen (H.KATING, 1955b), eine sogenannte "Eiweißhefe", läßt sich nicht verfetten. Schon 1/2% Asparagin in der Nährlösung führt zu einem N-Mangel, der sich in einer stark verminderten Trockensubstanzbildung zeigt, wobei sich das Verhältnis von Eiweiß zu Fett der Zelle im Vergleich zu den N-reichen Kulturen praktisch nicht ändert.

carbamoyl-transferase (1. Säulengruppe) erreicht bei N-armer Kultur nach 88 Std. mit der spezifischen Aktivität 1,3 zwar den höchsten Wert, jedoch beträgt die Aktivität nur rund ein Drittel derjenigen, die zu gleicher Zeit bei der N-reichen Kultur gefunden wird. Zu jedem Analysen-Zeitpunkt ist bei der

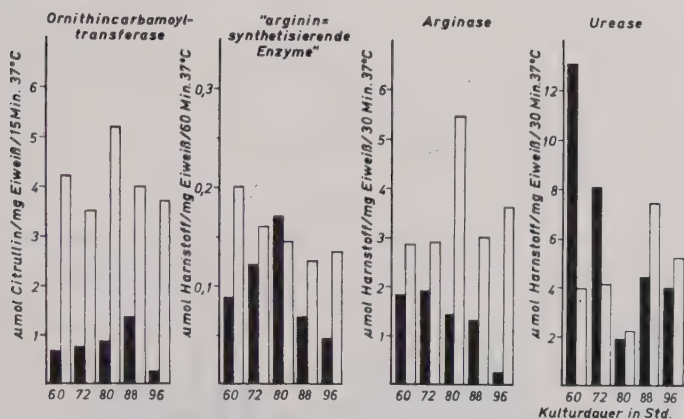


Abbildung 8: Der Einfluß der Asparagin-Konzentration im Nährmedium auf die Synthese der Enzyme des Ornithin-Cyclus in Aufwuchskulturen von *Endomycopsis vernalis*.
Jeweils Mittelwerte aus zwei Analysen.

■ 1/4% Asparagin, □ 1% Asparagin als N-Quelle

N-Mangelkultur eine geringere spezifische Aktivität des Enzyms vorhanden.- Die spezifische Aktivität der "argininsynthetisierenden Enzyme" (2. Säulengruppe) steigt bei N-Mangel bis zu 80 Std. Kulturdauer an, fällt danach jedoch (also zum Zeitpunkt der Erschöpfung der N-Quelle; s. Tab.8) stark ab. Die N-reich gezogene Kultur ist dagegen durch eine stetige Abnahme der Aktivität dieses Enzyms mit der fortschreitenden Kulturdauer gekennzeichnet. Nach 88 Std. beträgt die spezifi-

sche Aktivität der N-Mangelkultur etwa 50% von der der Parallelkultur.- Auch die spezifische Arginase-Aktivität (3. Säulengruppe) liegt bei N-Mangel zu jedem Zeitpunkt der Kulturdauer niedriger als bei normalen Kulturbedingungen; Nach 80 Std. etwa ein Viertel und nach 88 Std. etwa die Hälfte der Aktivität der N-reichen Kultur.- Lediglich bei der Urease (4. Säulengruppe) sind die spezifischen Aktivitäten in der jungen N-Mangelkultur (s. 60 und 72 Std.) höher als im Parallelansatz. Zum Zeitpunkt der Einstellung des Wachstums hingegen (80 bis 88 Std.) ist bei N-Mangel auch die Ureasesynthese wesentlich geringer.

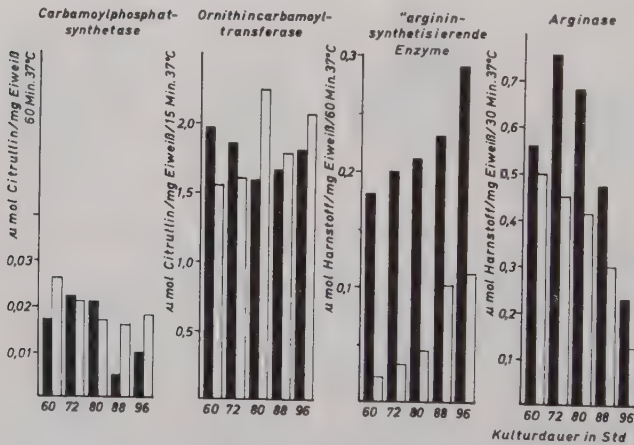


Abbildung 9: Der Einfluß der Asparagin-Konzentration im Nährmedium auf die Synthese der Enzyme des Ornithin-Cyclus in Aufwuchskulturen von *Torulopsis utilis*. Jeweils Mittelwerte aus zwei Analysen.

■ 1/2% Asparagin, □ 1% Asparagin als N-Quelle

Wesentlich andere Verhältnisse als bei der "Fettheife" E n d o -

mycopsis vernalis liegen bei der "Eiweißhefe" *Torulopsis utilis* vor (Abb.9). Die Carbamoylphosphat-synthetase (1. Säulengruppe) und die Ornithincarbamoyl-transferase (2. Säulengruppe) weisen außer geringfügigen Schwankungen während des Kulturverlaufes in ihren spezifischen Aktivitäten bei N-armer und N-reicher Vorzucht keine entscheidenden Unterschiede auf. Bei den "argininsynthetisierenden Enzymen" (3. Säulengruppe) steigen die Aktivitäten in der N-Mangelkultur mit der Kulturdauer stetig an und sind zu jedem Zeitpunkt um ein Mehrfaches höher als bei der Kultur auf der normalen Wöltje-Nährlösung. Auch die Arginase-Aktivität ist bei N-Mangelkulturen gegenüber der N-reichen Anzucht deutlich erhöht. In den älteren Kulturen nimmt die Enzym-Aktivität in beiden Ansätzen ab.

Die Fettheferen *Endomycopsis vernalis* und die Eiweißhefe *Torulopsis utilis* verhalten sich also beim Wachstum unter N-Mangelbedingungen hinsichtlich der spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus verschieden: Während *Endomycopsis* auf N-Mangel generell mit einer stark verminderten Synthese der Enzyme reagiert, liegen bei *Torulopsis* unter dieser Bedingung die entsprechenden Enzymaktivitäten bei N-armer Kultur gleich oder wesentlich höher ("argininsynthetisierende Enzyme" und Arginase) als bei den Parallelansätzen mit N-reicher Aufzucht.- Es ist unwahrscheinlich, daß bei *Torulopsis* eine Hemmung der Enzymsynthese durch die höhere Asparagin-Konzentration in der normalen Wöltje-Nährlösung vorliegt. 1% Asparagin ist nämlich im Vergleich mit N-äquivalenten anderen N-Verbindungen eine

sehr gute N-Quelle für diese Eiweißhefe. Eher kommt in der Förderung der Synthese der Enzyme des Ornithin-Cyclus in der N-Mangelkultur die Bedeutung dieses Kreisprozesses für den N-Stoffwechsel der freien N-Verbindungen in dieser Hefe zum Ausdruck: Unter N-Mangel wird bei der Eiweißhefe nämlich im Vergleich zu der N-reichen Aufzucht eine höhere spezifische Aktivität der Enzyme des Ornithin-Cyclus, die offensichtlich bei der Inkorporation der N-Quelle eine wichtige Rolle spielen, aufrecht gehalten (vgl. die gegenteilige Reaktion der Fettheferen *Endomycopsis*, die bei N-Mangel die Aktivität der N-assimilierenden Enzyme vermindert und auf eine gesteigerte Fettsynthese hin ausweicht).

Für die nachfolgenden Versuchsreihen zur Ermittlung der unterschiedlichen Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der gebotenen N-Quelle scheint die Zeit zwischen 80 und 88 Std. Kulturdauer günstig für die Umpflanzung auf das neue Nährmedium zu sein. In diesem Zeitraum läßt die Trockensubstanzproduktion bei beiden Organismen nach und der N-Mangel macht sich bei *Endomycopsis* in einem starken Absinken der Enzymsynthesen bemerkbar.

b) Bestimmung der Trockengewichtsproduktion nach Umpflanzung der Versuchsorganismen auf die zu prüfenden neuen N-Quellen

In Vorversuchen zu den geplanten Reihen über die Beeinflussung der Enzymaktivitäten nach Umpflanzung auf verschiedene N-Quellen sollte zunächst die Trockensubstanzproduktion unter diesen Bedingungen festgestellt werden.

Versuchsansatz: *Endomycopsis* wurde N-arm auf der Wöltje-Nährlösung mit 1/4% und *Torulopsis* mit 1/2% Asparagin 3 1/2 Tage lang vorgezogen. Das oberste Filter mit

der Pilzdecke wurde dann abgehoben und auf eine andere Kulturschale mit der neuen N-Quelle gegeben. Die zu prüfenden N-Quellen waren in drei Gruppen eingeteilt worden:

1. Ammoniumsuccinat und Aminosäuren (L-Asparagin, L-Alanin, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure), die gute N-Quellen für die Versuchsorganismen sind;
2. Harnstoff und die Aminosäuren des Ornithin-Cyclus (L-Ornithin, L-Arginin und L-Citrullin);
3. Harnstoffderivate: (Thioharnstoff, Phenylharnstoff, Biuret) und Guanin.

Die vorgenannten N-Verbindungen lagen in der Umpflanznährlösung N-äquivalent zu 1% Asparagin vor. Zum Zeitpunkt der Umpflanzung und nach 6, 12 und 24 Std. Kulturdauer auf der neuen Nährlösung wurde in je zwei Kulturschalen das Pilztrockengewicht bestimmt.- Zu den gleichen Zeitpunkten wurde auch das Pilzmaterial für die weiter unten beschriebenen Bestimmungen der Enzymaktivitäten in den Acetonpulver-Extrakten geerntet.

Für die in den Abb.10 - 14 dargestellten Wachstumskurven ist jeweils die Trockengewichtszunahme der Umpflanzkultur auf 1% Asparagin (= normale Wöltje-Nährlösung) als Bezug mit angegeben worden. *T o r u l o p s i s* wächst auf Asparagin, Ammoniumsuccinat und Alanin praktisch gleich gut. Die Trockengewichtszunahme auf Glutaminsäure und Asparaginsäure ist jedoch 24 Std. nach Umpflanzung etwa halb so groß wie auf Asparagin (Abb.10). Harnstoff und Arginin sind ebenfalls gute N-Quellen. Citrullin ermöglicht nur eine Zunahme des Trockengewichtes von 70% und Ornithin von 52% im Vergleich zu Asparagin (Abb.11).

E n d o m y c o p s i s wächst auf Ammoniumsuccinat, Alanin und Glutaminsäure praktisch gleich gut wie auf Asparagin, während die Trockensubstanzzunahme auf Asparaginsäure lediglich nur 32% Zunahme davon ausmacht (Abb.12). Harnstoff und die Aminosäuren des Ornithin-Cyclus bewirken mit geringfügigen Abweichungen die gleiche Trockensubstanzproduktion wie Asparagin (Abb.13).

Die Harnstoffderivate sind als N-Quellen für das Wachstum der *E n d o m y c o p s i s*-Kulturen nur bedingt geeignet: Mit

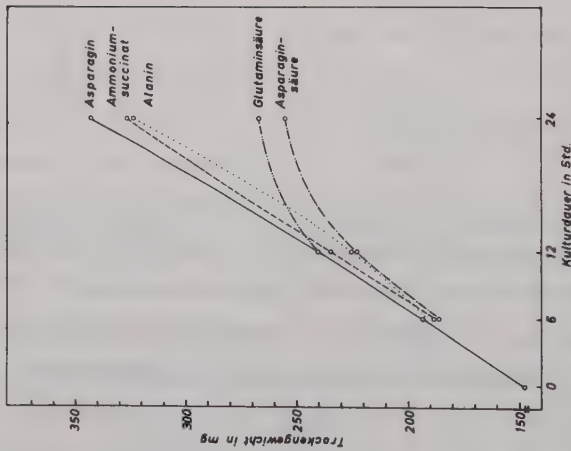


Abbildung 10: Trockengewichtszunahme von *T o r i o p s i s* nach Umpflanzung auf L-Asparagin, Ammoniumsuccinat, L-Alanin, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure als jeweils alleinige N-Quelle

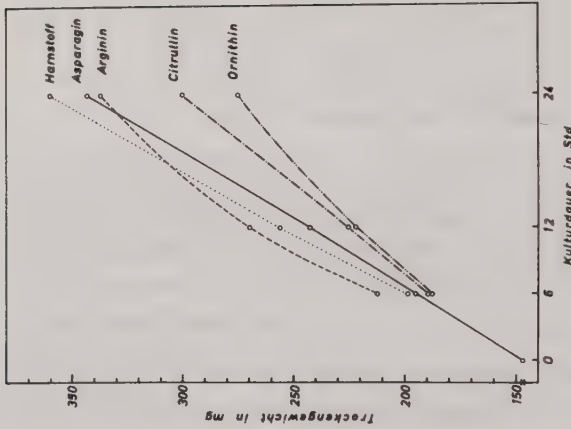


Abbildung 11: Trockengewichtszunahme von *T o r i o p s i s* nach Umpflanzung auf L-Asparagin, Harnstoff, L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin als jeweils alleinige N-Quelle

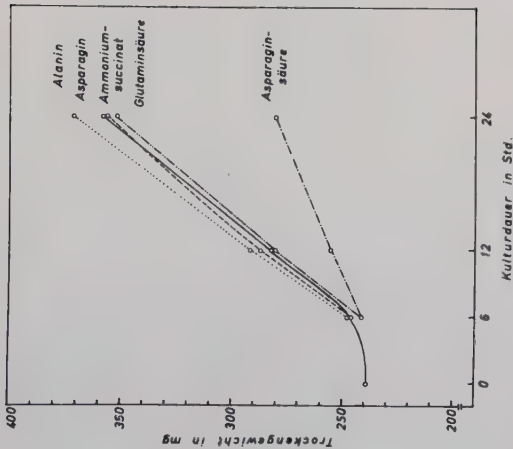


Abbildung 12: Trockengewichtszunahme von *Endomycosis* nach Umpflanzung auf L-Asparagin, Ammoniumsaccharat, L-Alanin, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure als jeweils alleinige N-Quelle

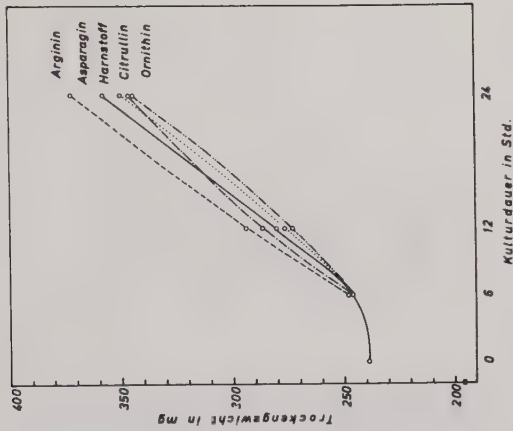


Abbildung 13: Trockengewichtszunahme von *Endomycosis* nach Umpflanzung auf L-Asparagin, Harnstoff, L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin als jeweils alleinige N-Quelle

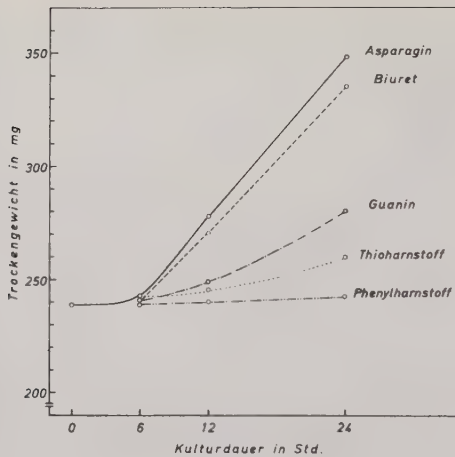


Abbildung 14: Trockengewichtszunahme von *Endomycopsis* nach Umpflanzung auf L-Asparagin, Biuret, Guanin, Thioharnstoff und Phenylharnstoff als jeweils alleinige N-Quelle

Biuret wird 90% der Substanzzunahme im Vergleich mit Asparagin als N-Quelle erzielt; die Zuwachsraten liegen bei Guanin mit 35% und bei Thioharnstoff mit 15% sehr niedrig; Phenylharnstoff hemmt während der Kulturdauer von 24 Std. das Wachstum praktisch vollständig.

Es muß für die im folgenden zu besprechenden Versuchsreihen über die Beeinflussung der Enzymaktivitäten durch die gebotenen N-Verbindungen festgehalten werden, daß

1. Ammoniumsuccinat, Harnstoff, Asparagin und die Aminosäuren sowohl *Torulopsis* als auch *Endomycopsis* ein gutes Wachstum ermöglichen. Lediglich auf Asparaginsäure (und zusätzlich Glutaminsäure bei

T o r u l o p s i s) ist die Trockensubstanzzunahme geringer,

2. Harnstoffderivate (außer Biuret) nur ein sehr geringes oder gar kein Wachstum von E n d o m y c o p s i s ermöglichen.

Für die zuerst genannten N-Verbindungen ist demnach anzunehmen, daß ihre nachfolgend zu interpretierenden Einflüsse auf die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus nicht auf ein unterschiedliches Wachstum der Versuchsorganismen zurückzuführen sind.

2. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus nach Umpflanzung auf Ammoniumsuccinat, L-Alanin, L-Asparaginsäure, L-Asparagin und L-Glutaminsäure

Nachfolgend werden die Analysen über die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus nach Umpflanzung der Versuchsorganismen auf neue N-Quellen (Vorzucht der beiden Hefen jeweils 3 1/2 Tage auf Asparagin) in Abhängigkeit von der Kulturdauer besprochen. Alle N-Quellen wurden N-äquivalent zu 1% Asparagin geboten. Die Aktivitäten der einzelnen Enzyme unter dem Einfluß der jeweils gefütterten N-Verbindung für E n d o m y c o p s i s und T o r u l o p s i s werden miteinander verglichen.

Carbamoylphosphat-synthetase: Die spezifische Aktivität des Enzyms zum Zeitpunkt 0 (= Zeitpunkt der Umpflanzung auf die neue N-Quelle) schwankt innerhalb gewisser Grenzen. Das hat seinen Grund darin, daß die einzelnen Kulturreihen zu verschiedenen Zeiten durchgeführt worden sind und deshalb zwangsläufig bei der Umpflanzung, je nach dem physiologischen Zustand der Vorkultur, die Enzymaktivität verschieden hoch war. Es ergibt sich daraus, daß weniger die Höhe der spezifischen Aktivität bei den verschiedenen N-Quellen verglichen werden kann, sondern vielmehr der Verlauf der Aktivitätskurve vom Zeitpunkt 0 aus diskutiert werden muß.

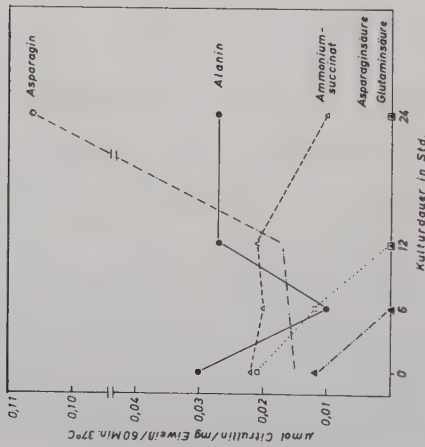


Abbildung 15: Einfluß von Ammoniumsuccinat, L-Alanin, L-Asparaginsäure, L-Asparagin und L-Glutaminsäure auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase in Umpfanzkulturen von *Endomycopsis vernalis*

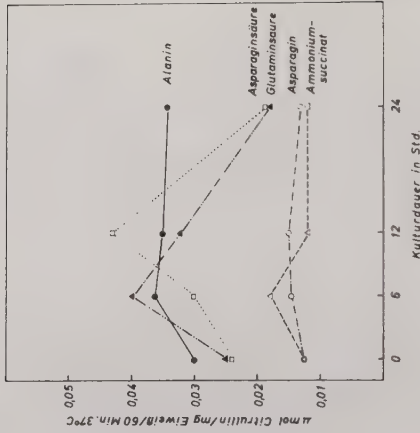


Abbildung 16: Einfluß von Ammoniumsuccinat, L-Alanin, L-Asparaginsäure, L-Asparagin und L-Glutaminsäure auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase in Umpfanzkulturen von *Torulopsis utilis*

E n d o m y c o p s i s (Abb. 15) verändert nach Vorzucht auf Asparagin und anschließender Umpflanzung der vorgezogenen Pilzdecke auf Ammoniumsuccinat und Alanin die spezifische Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase praktisch nicht. Das gleiche gilt im großen Ganzen auch für *T o r u l o p s i s* (Abb. 16), obwohl hier bei beiden N-Quellen unmittelbar nach der Umpflanzung (s. 6 Std. Kulturdauer) zunächst ein Anstieg der Enzymaktivität erfolgt. Auf Asparagin bleibt bei *T o r u l o p s i s* die Enzymaktivität konstant, während sie bei *E n d o m y c o p s i s* bei dieser N-Quelle stark ansteigt (von 0,015 auf etwa 0,11). Ganz anders liegen die Verhältnisse bei Asparaginsäure und Glutaminsäure: Bei *T o r u l o p s i s* fallen die Aktivitäten nach einem Anstieg (nach 0 bzw. 12 Std. Kulturdauer) unter den Ausgangswert zum Zeitpunkte 0 ab (Abb. 16); bei *E n d o m y c o p s i s* ist eine Aktivität dieses Enzyms bereits 12 Std. nach Umpflanzung nicht mehr nachweisbar.

Ornithincarbamoyl-transferase: Die Synthese dieses Enzyms wird durch die gleichen N-Verbindungen in anderer Weise als das vorher besprochene beeinflusst. Nur Asparaginsäure als N-Quelle bewirkt bei *E n d o m y c o p s i s* keine Änderung der spezifischen Enzymaktivität im Verlaufe der Kulturdauer (Abb. 17). Asparagin hingegen hat innerhalb von 24 Std. mit einem Aktivitätsanstieg um rund das Dreifache die stärkste fördernde Wirkung. Ammoniumsuccinat, Alanin und Glutaminsäure fördern ebenfalls die Enzymbildung, jedoch nicht so stark wie Asparagin. Es fällt auf, daß bei den fördernden N-Verbindungen erst 6 Std. nach der Umpflanzung der Aktivitätsanstieg eintritt.

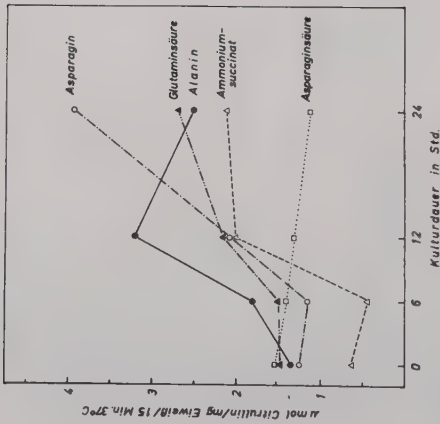


Abbildung 17: Einfluß von Ammoniumsuccinat, L-Alanin, L-Asparaginsäure, L-Asparagin und L-Glutaminsäure auf die Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase in Umpflanzkulturen von *Eudomyces vernalis*

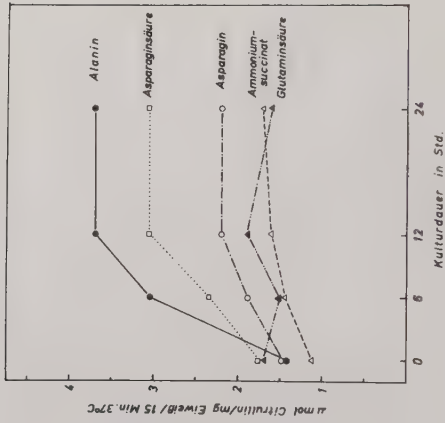


Abbildung 18: Einfluß von Ammoniumsuccinat, L-Alanin, L-Asparaginsäure, L-Asparagin und L-Glutaminsäure auf die Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase in Umpflanzkulturen von *Torulopsis utilis*

Bei *T o r u l o p s i s* (Abb. 18) hat nur Glutaminsäure - von geringen nicht signifikanten Schwankungen abgesehen - keinen Einfluß auf die Enzymsynthese. Ammoniumsuccinat und Asparagin steigern die Enzymbildung um etwa 50%, während Asparaginsäure einen Anstieg der spezifischen Aktivität um rund das Doppelte und Alanin um das Dreifache bewirkt. Im Gegensatz zu den Parallelansätzen mit *E n d o m y c o p s i s* erfolgt die Förderung vom Zeitpunkt der Umpflanzung an ohne Verzögerung und hat in allen Fällen nach 12 Std. ihr Optimum erreicht.

"Argininsynthetisierende Enzyme": In den Umpflanzkulturen von *E n d o m y c o p s i s* (Abb. 19) fördern - nach einer 6-stündigen Adaptationszeit an die neue N-Quelle - nur Glutaminsäure (um etwa das Fünffache) und Asparagin (um etwa ein Drittel) die Synthese dieser Enzyme. Die anderen N-Verbindungen haben keinen signifikanten Einfluß.

Bei *T o r u l o p s i s* (Abb. 20) wird die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" nur durch Asparagin um das Dreifache gesteigert. Durch Glutaminsäure (nach einer anfänglichen Steigerung) und Ammoniumsuccinat wird die Synthese der Enzyme auf praktisch Null herabgesetzt (s. 24 Std. bzw. 6 Std. Kulturdauer), während für Alanin und Asparaginsäure - außer den geringen Schwankungen während der Kulturdauer - keine Beeinflussung festzustellen ist.

Arginase: Einen hemmenden Einfluß auf die Arginase-Synthese übt bei *E n d o m y c o p s i s* (Abb. 21) wiederum Asparaginsäure aus. Glutaminsäure und Alanin bewirken eine Steigerung

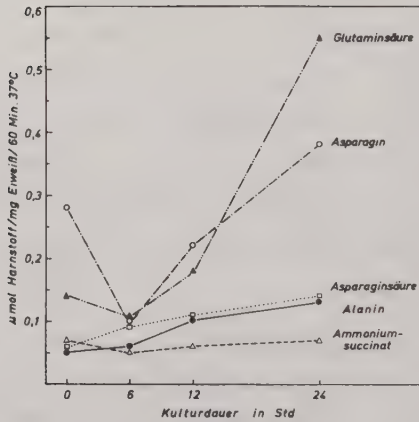


Abbildung 19: Einfluß von Ammoniumsuccinat, L-Alanin, L-Asparaginsäure, L-Asparagin und L-Glutaminsäure auf die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" in Umpflanzkulturen von *Endomycopsis vernalis*

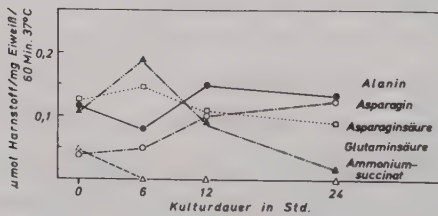


Abbildung 20: Einfluß von Ammoniumsuccinat, L-Alanin, L-Asparaginsäure, L-Asparagin und L-Glutaminsäure auf die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" in Umpflanzkulturen von *Torulopsis utilis*

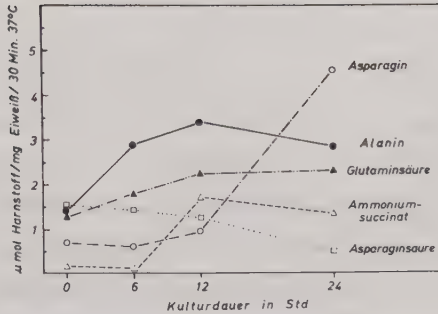


Abbildung 21: Einfluß von Ammoniumsuccinat, L-Alanin, L-Asparaginsäure, L-Asparagin und L-Glutaminsäure auf die Synthese der Arginase in Umpflanzkulturen von *Endomycopsis vernalis*

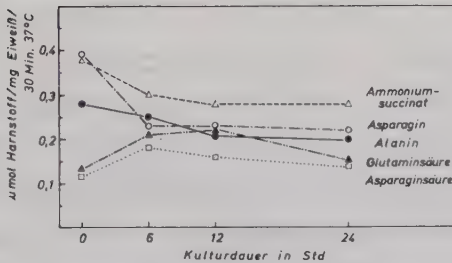


Abbildung 22: Einfluß von Ammoniumsuccinat, L-Alanin, L-Asparaginsäure, L-Asparagin und L-Glutaminsäure auf die Synthese der Arginase in Umpflanzkulturen von *Torulopsis utilis*

der spezifischen Aktivität um rund 80% bzw. 100%, während Asparagin und Ammoniumsuccinat nach einer kurzen Adaptationszeit die Bildung dieses Enzyms um das Fünffache bzw. Siebenfache fördern.

Bei *T o r u l o p s i s* (Abb. 22; beachte den um eine Zehnerpotenz kleineren Maßstab gegenüber Abb. 21) haben nur die beiden Aminodicarbonsäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure eine - verhältnismäßig gering - fördernde Wirkung auf die Bildung der Arginase. Hierbei wird das Syntheseoptimum nach 6 Std. bzw. 12 Std. erreicht. Ammoniumsuccinat, Alanin und Asparagin als N-Quelle führen nach der Umpflanzung zunächst zu einer Verminderung der Enzymsynthese des Organismus. Ab 12 Std. nach der Umpflanzung bleibt die spezifische Enzymaktivität konstant.

Die Ergebnisse der Versuche über die Beeinflussung der Synthese der Enzyme des Ornithin-Cyclus durch die ausgewählten N-Quellen lassen sich kurz folgendermaßen zusammenfassen: Asparagin fördert bei *E n d o m y c o p s i s* die Bildung sämtlicher Enzyme des Cyclus. Hiermit wird nicht nur ein weiterer Beweis dafür erbracht, daß Asparagin eine vorzügliche N-Quelle für die Kultur dieser Hefe ist (s. S. HEIDE, 1939 und H. KATING, 1955a), sondern es wird darüber hinaus auch eine Beteiligung des Ornithin-Cyclus bei der Assimilation und Inkorporation dieser N-Quelle wahrscheinlich gemacht. Anders verhält sich *T o r u l o p s i s*. Die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase wird durch Asparagin nicht gefördert; die Synthese der Arginase wird gehemmt.- Es sei darauf hingewiesen, daß die hier gefundenen Förderungen der Enzymaktivitäten durch

Asparagin bei Umpflanzkulturen im Verlaufe des Wachstums ermittelt wurden. Bei 3 1/2 Tage alten Aufwuchskulturen (s. Abb. 6 und 7; S. 35 und 37) von *Endomycopsis* und *Torulopsis* zeigten sich im Vergleich mit anderen N-Quellen diese Förderungen nicht.

Durch Asparaginsäure und Glutaminsäure werden sowohl bei *Endomycopsis* als auch bei *Torulopsis* die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase und der Arginase gehemmt. Diese beiden Aminosäuren hemmen auch die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" bei *Torulopsis*, während Glutaminsäure die spezifische Aktivität dieses Enzyms bei *Endomycopsis* fördert. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß *Torulopsis* bei Umpflanzung auf Asparaginsäure und Glutaminsäure gegenüber den anderen N-Quellen eine um etwa 50% verminderte Trockengewichtsproduktion hat (s. Abb. 10; S. 52); bei *Endomycopsis* ist die Wachstumszunahme auf Asparaginsäure im Vergleich zu den anderen N-Verbindungen etwa 70% geringer (s. Abb. 12; S. 53). Weitere Untersuchungen müssen klären, ob diese beiden Aminosäuren spezifische Inhibitoren für die genannten Enzyme sind oder ob die verminderte Enzymaktivität in einem unmittelbaren Zusammenhang mit den Wachstumsdepressionen steht.

Hervorzuheben ist noch die Wirkung von Ammoniumsuccinat; während bei *Endomycopsis* die Synthesen von Ornithin-carbamoyl-transferase und Arginase gefördert werden, sind bei *Torulopsis* sämtliche Enzyme des Ornithin-Cyclus durch diese Verbindung - verschieden stark - gehemmt (vgl. hierzu die Ergebnisse der Aufwuchskulturen; Abb. 6 und 7; S. 35 und 37).

Hiermit steht in einem scheinbaren Widerspruch, daß nach H. KATING (1962a) Ammoniumgaben eine verstärkte Synthese des Harnstoffs über den Ornithin-Cyclus bei dieser Hefe bewirken. Dieser Widerspruch löst sich, wenn man bedenkt, daß auf der N-Quelle Ammoniumsuccinat noch beachtliche Aktivitäten z.B. der Arginase und anderer Enzyme des Cyclus vorhanden sind. Weiterhin ist zu beachten, daß die Enzyme des Ornithin-Cyclus beim Wachstum von *T o r u l o p s i s* unter N-Mangelbedingungen eine größere spezifische Aktivität als bei Kultur auf normaler Wöltje-Nährlösung aufweisen (s. Abb. 9, S. 48). Es wird bei *T o r u l o p s i s* also nach Umpflanzung durch Verminderung der spezifischen Aktivität der "Normalspiegel" bei einigen Enzymen eingestellt. Diejenigen N-Verbindungen, die nach N-armer Vorzucht und anschließender Umpflanzung von *T o r u l o p s i s* auf die neue N-Quelle eine Steigerung von Enzymsynthesen bewirken (Asparagin bei der Ornithincarbamoyltransferase und den "argininsynthetisierenden Enzymen" und Alanin und Asparaginsäure bei der Ornithincarbamoyl-transferase), sind deshalb bemerkenswert.

3. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus nach Umpflanzung auf Harnstoff, L-Ornithin, L-Arginin und L-Citrullin

Von besonderem Interesse war es zu prüfen, wie Harnstoff und die Aminosäuren des Ornithin-Cyclus die Enzymaktivitäten des Kreisprozesses im Verlaufe des Wachstums beeinflussen. Die Analysen sollten gleichzeitig als Kontrolle für die bei den 3 1/2 Tage alten Aufwuchskulturen der beiden Versuchorganismen festgestellten Hemmungen und Förderungen der Enzymsynthesen

dienen (s. Abb. 6 u. 7, S. 32ff).

Carbamoylphosphat-synthetase: Lediglich Harnstoff wirkt bei *E n d o m y c o p s i s* (Abb. 23) fördernd auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase. Die spezifische Aktivität steigt von der 6. bis zur 12. Std. nach Umpflanzung auf diese N-Quelle um mehr als das Vierfache an. Auf Citrullin und Ornithin hingegen sinkt die spezifische Aktivität schnell auf Null; Arginin als N-Quelle verändert die Enzymaktivität nicht.

Die Umpflanzkulturen von *T o r u l o p s i s* (Abb. 24) verhalten sich anders: Hier steigt innerhalb der ersten 6 Std. nach Umpflanzung auf Arginin die Enzymaktivität auf das Vierfache an und bleibt dann im Verlaufe der Kultur in etwa der gleichen Höhe; Harnstoff und Ornithin beeinflussen die Enzymbildung gegenüber dem Zeitpunkt der Umpflanzung nicht (oder nur gering), während allein auf Citrullin die Enzymsynthese bereits 6 Std. nach der Umpflanzung praktisch zum Stillstand kommt.

Für *E n d o m y c o p s i s* werden mit den obengenannten Ergebnissen die in Abb. 6 wiedergegebenen Befunde über den Einfluß dieser N-Verbindungen auf die Enzymaktivität bei 3 1/2 Tage alten Aufwuchskulturen bestätigt.

Ein Vergleich der spezifischen Enzymaktivität bei den 3 1/2 Tage alten Aufwuchskulturen von *T o r u l o p s i s* (Abb. 7) mit der bei den Umpflanzkulturen zeigt einige überraschende Unterschiede. Während bei den Aufwuchskulturen weder auf Ornithin, Citrullin noch Arginin eine spezifische Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase gemessen wurde, trifft dies bei den vorgezogenen Pilzdecken nur für Citrullin als N-Quelle zu. Ar-

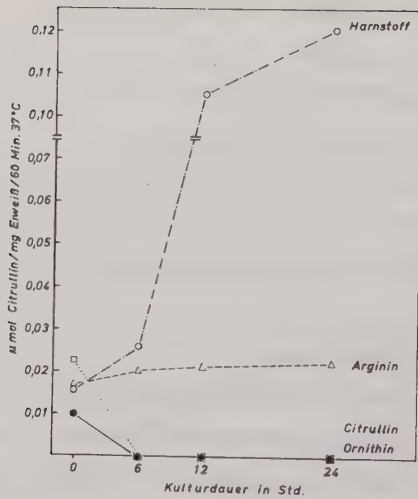


Abbildung 23: Einfluß von Harnstoff, L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase in Umpfanzkulturen von *Endomycopsis vernalis*

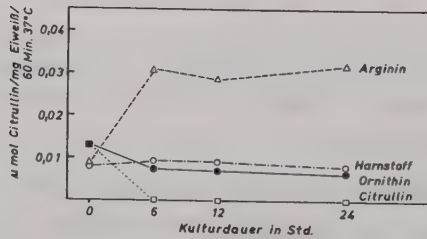


Abbildung 24: Einfluß von Harnstoff, L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase in Umpfanzkulturen von *Torulopsis utilis*

ginin fördert hingegen die Enzymsynthese stark. Es kommt hierin offenbar auch die Verschiedenheit zwischen *E n d o - m y c o p s i s* und *T o r u l o p s i s* zum Ausdruck, auf die schon wiederholt hingewiesen wurde. Ein wichtiger Faktor scheint es zu sein, daß *T o r u l o p s i s* Carbamylphosphat noch auf einem anderen Wege zu bilden vermag (Spaltung von Harnstoff in je eine transferierbare Carbamyl- und Aminogruppe, s. auch S. 42), so daß im Gegensatz zu den Verhältnissen bei *E n d o m y c o p s i s* (Harnstoffspaltung in Ammoniak und Kohlendioxid) nicht eine Induzierung der Carbamoylphosphat-synthetase notwendig erscheint.

Ornithincarbamoyl-transferase: Die stetige Steigerung der spezifischen Aktivität des Enzyms (rund 1,2) nach Umpflanzung von *E n d o m y c o p s i s* (Abb. 25) auf Harnstoff (spezifische Aktivität nach 24 Std. = 4,6), Citrullin (4,3) und Arginin (3,0) zeigt eine starke Förderung der Synthese dieses Enzyms an, die bei Versuchsabbruch noch nicht abgeschlossen zu sein scheint. Ein weiterer Aktivitätsanstieg nach dem letzten Erntetermin ist wahrscheinlich, denn in den Versuchsansätzen ohne Umpflanzung (s. Abb. 6) liegt die spezifische Aktivität für dieses Enzym nach 3 1/2 Tagen Kulturdauer fast doppelt so hoch. Lediglich Ornithin beeinflusst die Enzymbildung nicht.- Diese Versuche bestätigen die schon bei den Aufwuchskulturen (Abb. 6) gezogenen Schlüsse über den Einfluß dieser N-Verbindungen auf die Enzymsynthese.

Wiederum liegen bei der Eiweißhefe *T o r u l o p s i s* (Abb. 26) andere Einflüsse dieser N-Verbindungen vor: Harnstoff und Arginin beeinflussen die Enzymsynthese (im Gegensatz zu den

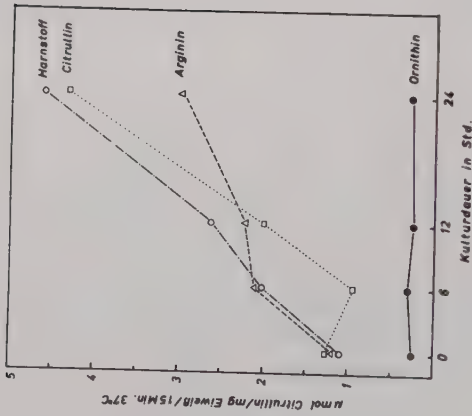


Abbildung 25: Einfluß von Harnstoff, L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin auf die Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase in Umpfanzkulturen von *Endomycopsis vernalis*

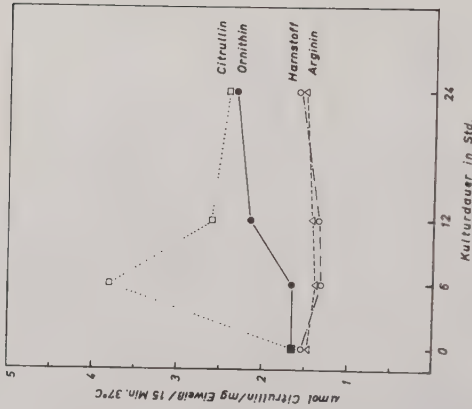


Abbildung 26: Einfluß von Harnstoff, L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin auf die Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase in Umpfanzkulturen von *Torulopsis utilis*

E n d o m y c o p s i s-Ansätzen) nicht; Ornithin wirkt schwach fördernd (33% Steigerung nach 12 Std.), während lediglich Citrullin (6 Std. nach Umpflanzung ein plötzlicher starker Anstieg um mehr als das Doppelte) die Enzymsynthese deutlich fördert.- Die gleichen Wirkungen ließen sich für die Ornithincarbamoyl-transferase auch schon aus den 3 1/2 Tage alten Aufwuchskulturen ablesen (vgl. Abb. 7). Citrullin als Endprodukt wirkt bei beiden Organismen fördernd auf die Enzymsynthese.

Wiederum ist es auffallend, daß bei T o r u l o p s i s Harnstoff und Arginin anders als bei E n d o m y c o p s i s wirken, wo eine deutliche Förderung der Enzymsynthese auftrat. Der unterschiedliche Einfluß, den Harnstoff und Arginin bei den beiden Versuchsorganismen auf die Ornithincarbamoyl-transferase haben, macht es wahrscheinlich, daß bei T o r u l o p s i s ein anderes Enzym als die Ornithincarbamoyl-transferase die aus der Harnstoffspaltung stammende Carbamylgruppe auf Ornithin zur Citrullinbildung (und Glutaminsäurebildung im Falle der ebenfalls resultierenden Aminogruppe) überträgt. H. KATING (1962b) spricht bei T o r u l o p s i s von einer gekoppelten Reaktion (Harnstoffspaltung und Transferierung der Carbamyl- und Aminogruppe).

"Argininsynthetisierende Enzyme": Mit Ausnahme von Ornithin fördern die gebotenen N-Quellen die Enzymsynthese bei E n d o m y c o p s i s (Abb. 27). Umpflanzung auf die N-Quelle Arginin bringt einen sofortigen starken Anstieg der enzymatischen Aktivität in den ersten 12 Std., danach sinkt die spezifische Aktivität ab. Bei Harnstoff und Citrullin setzt der geringe Aktivitätsanstieg erst nach 12 Std. ein und bleibt dann etwa

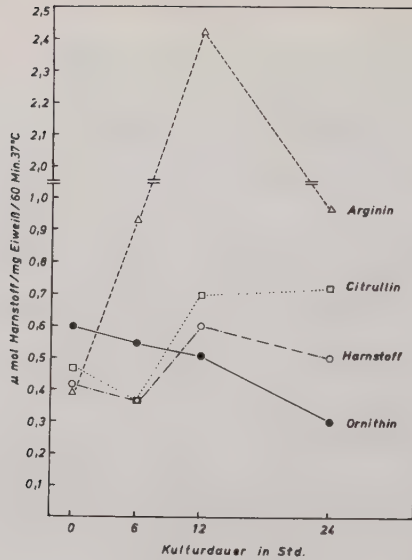


Abbildung 27: Einfluß von Harnstoff, L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin auf die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" in Umpflanzkulturen von *Escherichia coli*

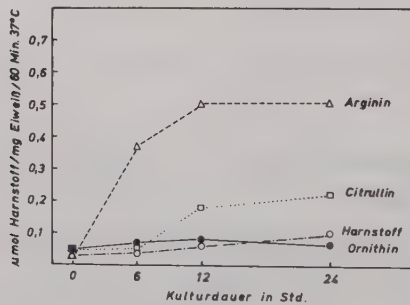


Abbildung 28: Einfluß von Harnstoff, L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin auf die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" in Umpflanzkulturen von *Torulopsis utilis*

in gleicher Höhe.

In fast gleicher Weise wirken diese N-Verbindungen auf die "argininsynthetisierenden Enzyme" von *Torulopsis* (Abb. 28): Arginin fördert die Enzymsynthese am stärksten; nach 6 Std. wurde die zwölffache, nach 12 Std. Kulturdauer die sechzehnfache spezifische Aktivität gemessen. Im Gegensatz zu *Endomycopsis* fällt die Aktivität bis zum Versuchsabbruch nicht ab. Bei Citrullin als N-Quelle läuft die Enzymsynthese langsam an, erreicht aber nach 12 Std. mehr als die vierfache und nach 24 Std. die fünffache Aktivität (0,22). In der Harnstoffkultur hatte die spezifische Aktivität nach 24 Std. den dreifachen Wert gegenüber dem Zeitpunkt der Umpflanzung erreicht. L-Ornithin als N-Quelle fördert die Enzymbildung nur schwach (die gemessenen Werte überschreiten kaum die Fehlergrenze).

Für *Endomycopsis* und *Torulopsis* bestätigen diese Analysen die schon bei den Aufwuchskulturen (Abb. 6 u. 7) gezogenen Schlüsse über den Einfluß der hier besprochenen N-Verbindungen auf die Enzymaktivitäten. Hervorzuheben ist, daß auch durch die Umpflanzversuche bestätigt wird, daß Arginin als Endprodukt der Wirkung der "argininsynthetisierenden Enzyme" ein besserer Förderer für diese Synthese ist als Citrullin, das Substrat für diese Enzyme.

Arginase: Sowohl bei *Endomycopsis* (Abb. 29) als auch bei *Torulopsis* (Abb. 30) fördern die gebotenen N-Quellen die Enzymsynthesen. Die höchste spezifische Aktivität wird bei beiden Hefen auf Citrullin (10,5 bzw. 7,3 nach 24 Std. Kulturdauer) erzielt. Arginin, Harnstoff und Ornithin

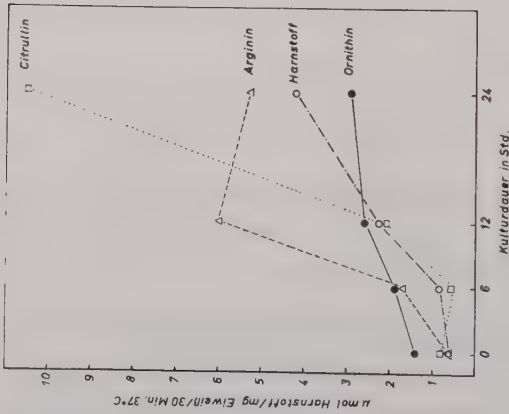


Abbildung 29: Einfluß von Harnstoff, L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin auf die Synthese der Arginase in Umpflanzkulturen von *Endomycolis vernalis*

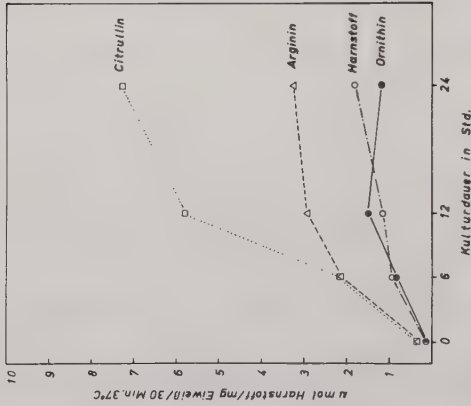


Abbildung 30: Einfluß von Harnstoff, L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin auf die Synthese der Arginase in Umpflanzkulturen von *Torulopsis utilis*

fördern die Enzyymbildung weniger stark.

Gegenüber den 3 1/2 Tage alten Aufwuchskulturen bringen die Umpflanzkulturen etwas andere Verhältnisse. Im Gegensatz zu den *E n d o m y c o p s i s*-Aufwuchskulturen (Abb. 6) steigern die vorgezogenen Pilzdecken auf Ornithin die Arginasebildung. In den Aufwuchskulturen von *T o r u l o p s i s* (Abb. 7) wurde auf Harnstoff und Ornithin keine Arginase-Aktivität gefunden. Bei beiden Organismen induziert in den Umpflanzkulturen Citrullin (und nicht Arginin, wie in den Aufwuchskulturen) die Enzyymbildung weitaus am stärksten (vgl. S. 42f).

4. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus nach Umpflanzung von *E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s* auf Biuret, Thioharnstoff, Phenylharnstoff und Guanin

Da *E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s* auf Harnstoff als N-Quelle gut wächst und hierbei auch die Synthesen aller Enzyme des Ornithin-Cyclus gefördert werden, war es von Interesse, den Einfluß von Harnstoffderivaten (Biuret, Thioharnstoff, Phenylharnstoff) und Guanin auf die Enzymsynthesen zu prüfen. Orientierende Versuche, Biuret mittels Acetonpulver-Extrakten von *E n d o m y c o p s i s* bzw. mittels eines reinen Ureasepräparates (Fa. Serva) zu spalten, zeigten, daß aus diesem Harnstoffderivat nur zu einem geringen Prozentsatz (im Vergleich zum parallelen Ansatz mit Harnstoff) Ammoniak freigesetzt wird (s. auch H. KATING, 1959). Die spezifische Urease-Aktivität wird durch Biuret bis zu einer Konzentration des Derivates von 80 µmol/ml Inkubationslösung nicht beeinflusst (s. Tab. 6, S. 26). Andererseits wächst aber *E n d o m y c o p s i s* (s. die Wachstumskurven Abb. 14, S. 54) auf Biuret fast

so gut wie auf Asparagin. Guanin und Thioharnstoff ermöglichen nur ein geringes Wachstum, während Phenylharnstoff für die Hefe als N-Quelle nicht verwertbar ist.

Wie in den vorhergehenden Versuchen wurde *Endomycopsis* auf 1/4% Asparagin N-arm vorgezogen und die Pilzdecken nach 3 1/2 Tagen auf neue Nährlösungen umgepflanzt, die jeweils (N-äquivalent zu 1% Asparagin) Biuret, Thioharnstoff, Phenylharnstoff bzw. Guanin als N-Quelle enthielten. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus im Verlaufe der Kulturdauer (nach der Umpflanzung) sind in den Abbildungen 31 - 34 wiedergegeben worden. Die Ergebnisse sind kurz zusammengefaßt folgende: Die *Carbamoylphosphat-synthetase* (Abb. 31) wird durch alle gebotenen Harnstoffderivate und Guanin vollständig gehemmt.

Die *Ornithincarbamoyl-transferase* (Abb. 32) wird durch Guanin total gehemmt; Phenylharnstoff hemmt stark; Biuret und Thioharnstoff haben keinen Einfluß (s. aber die nicht signifikante vorübergehende Steigerung der Enzymaktivität bei Biuret) auf die Enzymsynthese: Die Aktivität zu Beginn der Umpflanzung bleibt bei den beiden letztgenannten Verbindungen in etwa gleicher Höhe nachweisbar.

Die "*argininsynthetisierenden Enzyme*" (Abb. 33) werden durch Biuret und Thioharnstoff vollständig gehemmt. Phenylharnstoff zeigt keinen Einfluß, während Guanin eine geringe Förderung der spezifischen Enzymaktivität bewirkt.

Die *Arginase* - Synthese (Abb. 34) wird durch Biuret erst

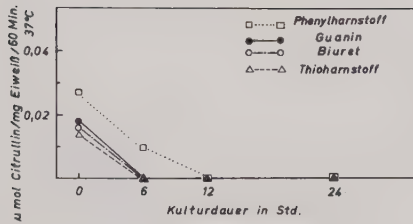


Abbildung 31: Einfluß von Harnstoffderivaten (Biuret, Thioharnstoff, Phenylharnstoff) und Guanin auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase in Umpflanzkulturen von *Endomycopsis vernalis*

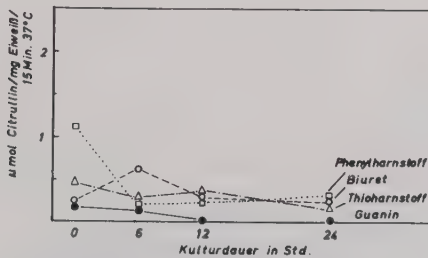


Abbildung 32: Einfluß von Harnstoffderivaten (Biuret, Thioharnstoff, Phenylharnstoff) und Guanin auf die Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase in Umpflanzkulturen von *Endomycopsis vernalis*

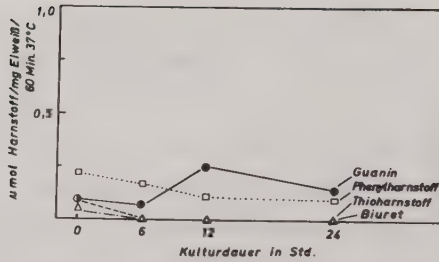


Abbildung 33: Einfluß von Harnstoffderivaten (Biuret, Thioharnstoff, Phenylharnstoff) und Guanin auf die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" in Umpflanzkulturen von *Endomycopsis vernalis*

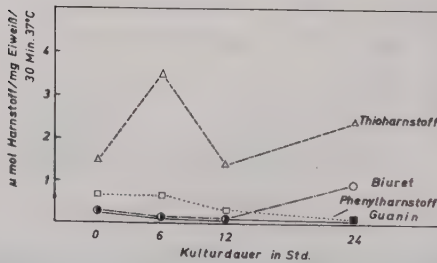


Abbildung 34: Einfluß von Harnstoffderivaten (Biuret, Thioharnstoff, Phenylharnstoff) und Guanin auf die Synthese der Arginase in Umpflanzkulturen von *Endomycopsis vernalis*

nach 24 Std. und durch Thioharnstoff (beachte den Syntheseanstieg nach 6 Std.!) schwach gefördert, während Phenylharnstoff keine Wirkung ausübt. Guanin hemmt die Enzymbildung vollständig.

Ein Vergleich der Harnstoffwirkung bei den 3 1/2 Tage alten Aufwuchskulturen (Abb. 6) und den Umpflanzkulturen (Abb. 23, 25, 27 u. 29) mit der Wirkung der Harnstoffderivate und Guanin (Abb. 31 - 34) auf die Synthese der Enzyme des Ornithin-Cyclus ergibt folgendes: Wächst *Endomycopsis* auf Harnstoff als N-Quelle, so wird die Bildung aller Enzyme gefördert. Es ist sicher, daß ein Teil der Spaltprodukte des Harnstoffs über diesen Kreisprozeß assimiliert wird. Bis auf die "argininsynthetisierenden Enzyme", die durch Guanin schwach gefördert werden (Abb. 33) und auf die geringfügige Induzierung der Arginasebildung durch Biuret und Thioharnstoff (Abb. 35), hemmen die geprüften Harnstoffderivate und Guanin die Synthesen der Enzyme des Cyclus. Häufig liegt Totalhemmung vor.- Der fördernde Einfluß von Harnstoff auf die Bildung der Enzyme des Ornithin-Cyclus einerseits und die Tatsache andererseits, daß der Inhibitor Biuret eine gute N-Quelle für *Endomycopsis* ist (s. Abb. 14, S. 54), lassen vermuten, daß diese Verbindung nicht wie Harnstoff (= Ureasewirkung und Anregung der Enzyme des Kreisprozesses) über den Ornithin-Cyclus in den Stoffwechsel des Pilzes einbezogen wird.

5. Die spezifische Aktivität der Urease von *Endomycopsis vernalis* nach der Umpflanzung auf verschiedene N-Quellen

Der beim Ablauf des Ornithin-Cyclus und durch die Wirksamkeit

der Arginase gebildete Harnstoff wird bei *Endomycopsis* durch die Urease gespalten. Es interessierte deshalb, wie dies im Anschluß an den Ornithin-Cyclus eingreifende Enzym durch die in den vorstehenden Kapiteln geprüften N-Verbindungen in seiner spezifischen Aktivität beeinflusst wird. Die untersuchten Verbindungen wurden wiederum (nach N-armer Vorzucht von *Endomycopsis* auf 1/4% Asparagin) als alleinige N-Quellen geboten.

Harnstoffderivate und Guanin: Im Anschluß an die Untersuchungen, die im vorhergehenden Kapitel wiedergegeben worden sind, wurden zunächst die spezifische Aktivität der Urease nach Wachstum auf den Harnstoffderivaten und Guanin geprüft (Abb. 35). Biuret veränderte nicht die Enzymaktivität während der Versuchsdauer; Thioharnstoff, Phenylharnstoff und Guanin senkten die spezifische Aktivität der Urease gegenüber den Werten, die zum Zeitpunkt der Umpflan-

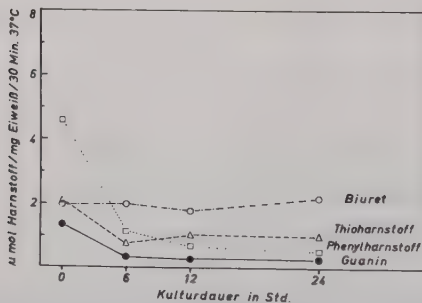


Abbildung 35: Einfluß von Harnstoffderivaten (Biuret, Thioharnstoff, Phenylharnstoff) und Guanin auf die Synthese der Urease in Umpflanzkulturen von *Endomycopsis vernalis*

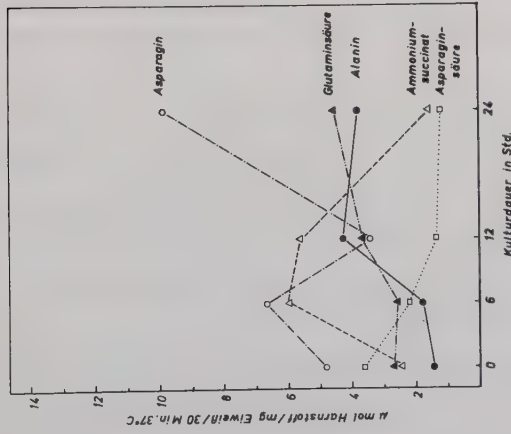


Abbildung 36: Einfluß von Ammoniumsuccinat, L-Alanin, L-Asparaginsäure, L-Asparagin und L-Glutaminsäure auf die Synthese der Urease in Umpflanzkulturen von *Endomyopsis vernalis*

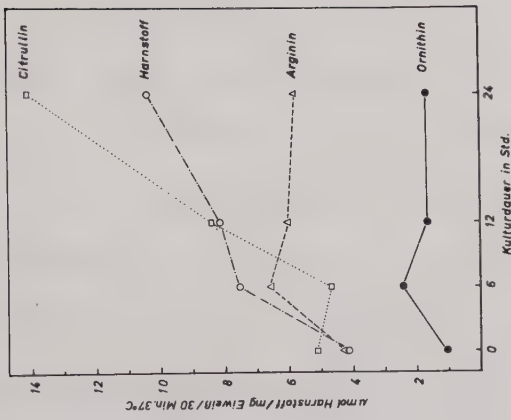


Abbildung 37: Einfluß von Harnstoff, L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin auf die Synthese der Urease in Umpflanzkulturen von *Endomyopsis vernalis*

zung gemessen wurden.- Es wird durch diese Versuche der Schluß (s.S. 77), daß speziell Biuret, das zwar von E n d o m y c o p s i s als N-Quelle genutzt werden kann, aber wohl nicht über den Ornithin-Cyclus assimiliert wird, dahingehend erweitert, daß wahrscheinlich auch nicht die Urease bei der Inkorporierung dieser N-Verbindungen beteiligt ist.

A m m o n i u m s u c c i n a t, A s p a r a g i n und A m i n o s ä u r e n (Abb. 36): Umpflanzung auf Alanin, Asparagin und Glutaminsäure fördern die Urease-Synthese um rund 100%. Hierbei ist es bemerkenswert, daß die spezifische Urease-Aktivität bei Asparagin 12 Std. nach der Umpflanzung unter dem Wert zum Zeitpunkt Null liegt und dann schnell ansteigt. Asparaginsäure hemmt die Ureasebildung auf rund 35% des zum Zeitpunkt der Umpflanzung gemessenen Wertes. Ammoniumsuccinat fördert die Urease-Synthese innerhalb der ersten 6 Std. der Kulturdauer um mehr als 100%; nach 24 Std. liegt jedoch die spezifische Aktivität des Enzyms weit unter dem Ausgangswert zu Beginn der Umpflanzung. Dieser Befund überrascht, weil eher anzunehmen wäre, daß Ammonium als Endprodukt der Ureasewirkung vielleicht gerade zu Anfang der Kultur, wenn es in größerer Konzentration vorliegt, hemmen würde. Es sei aber darauf hingewiesen, daß 3 1/2 Tage alte Aufwuchskulturen nach Wachstum auf Ammoniumsuccinat eine Urease-Aktivität aufweisen, die etwa derjenigen entspricht, die nach 6 Std. Kulturdauer in den Umpflanzkulturen gefunden wurde (vgl. Tab. 5, S. 20).

H a r n s t o f f, O r n i t h i n, C i t r u l l i n und A r g i n i n (Abb. 37): Harnstoff als Substrat für die Urease führt zu einer sofortigen verstärkten Bildung des Enzyms (spe-

zifische Aktivität 10,4 nach 24 Std.). Citrullin (spezifische Aktivität 14,1 nach 24 Std.) induziert die Urease-Synthese wesentlich stärker. Die Synthese setzt aber bei Citrullin erst 6 Std. nach der Umpflanzung ein. Arginin und Ornithin fördern die Enzyymbildung nur schwach.- Die Wirkung dieser vier geprüften N-Verbindungen ähnelt in der Induzierung der Enzyymbildung auffallend den Förderungen der Arginase-Synthese bei *E n d o m y c o p s i s* (Abb. 29, S. 72)[und auch bei *T o r u l o p s i s* (Abb. 30, S. 72)] durch die gleichen Substanzen (vgl. den Verlauf der Kurven in den graphischen Darstellungen).- Es liegt der Schluß nahe, daß bei *E n d o m y c o p s i s* parallel mit der verstärkten Bildung der Arginase eine Förderung der Synthese der Urease einhergeht.

D. D I S K U S S I O N D E R E R G E B N I S S E

Die Ergebnisse, die die Analysen der spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus bei 3 1/2 Tage alten Kulturen (sogenannte Aufwuchskulturen) von *E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s* und *T o r u l o p s i s u t i l i s* erbracht haben, sind auf Seite 40 ff diskutiert worden. Diese Befunde werden zum Teil durch die mit den sogenannten Umpflanzkulturen gewonnenen Ergebnissen modifiziert. Die N-arm vorgezogenen Pilzdecken stehen nämlich im N-Hunger, und die Beeinflussung der Enzyymbildung kommt deshalb durch die gebotenen neuen N-Quellen (N-reich!) im Verlaufe der Kulturdauer nach der Umpflanzung be-

sonders deutlich zum Ausdruck.

Folgende Befunde sind von Interesse: Harnstoff induziert bei *Endomycopsis* sowohl in den Aufwuchs- als auch in den Umpflanzkulturen die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase. Bei *Torulopsis*-Umpflanzkulturen hingegen wird die Synthese dieses Enzyms durch Harnstoff nicht gefördert, während jedoch Arginin, das in Aufwuchskulturen die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase vollständig hemmt, in Umpflanzkulturen als einzige Aminosäure des Ornithin-Cyclus die Enzymbildung induziert.- Eine Erklärung hierfür kann zur Zeit noch nicht gegeben werden.

Hinsichtlich der Förderung bzw. Hemmung der Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase reagieren die beiden Hefen verschieden auf die gebotenen N-Verbindungen: Während die Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase bei *Endomycopsis* durch Harnstoff, Citrullin und Arginin stark gefördert wird, übt Ornithin keinen Einfluß darauf aus. Bei *Torulopsis* hingegen wird die Bildung dieses Enzyms durch Ornithin und Citrullin induziert; Harnstoff und Arginin üben weder eine Hemmung noch Förderung aus.- Die unterschiedliche Wirkung, die Harnstoff und Arginin auf die Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase bei *Endomycopsis* (starke Förderung) und *Torulopsis* (keine Förderung) haben, stehen im Einklang mit den Befunden von R.F. RAMALEY u. R.W. BERNLOHR (1966) und R.W. BERNLOHR (1966) bei *Bacillus licheniformis*. Bei diesem Bacillus werden zwei verschiedene Ornithincarbamoyl-transferasen angenommen; die Synthese der einen wird durch Arginin induziert, die der anderen erleidet eine Repression. Auch

bei *T o r u l o p s i s* scheint eine zweite Ornithincarbamoyl-transferase mit großer Wahrscheinlichkeit vorzuliegen. Sie dürfte bei der Harnstoffnutzung ohne Ureasewirksamkeit, die über eine Spaltung des Harnstoffs in einen Carbamylrest und eine Aminogruppe verläuft, wobei diese Spaltprodukte nicht frei werden, sondern einmal auf Ornithin zur Citrullinbildung und zum anderen auf α -Ketoglutar säure zur Glutaminsäuresynthese in einer gekoppelten Reaktion transferiert werden (H. KATING, 1962b), wirksam sein. Daß dies Enzym verschieden ist von der im normalen Ablauf des Ornithin-Cyclus wirksamen Ornithincarbamoyl-transferase, geht im Zusammenhang mit dem obengenannten Befund von R.W. BERNLOHR (1966) daraus hervor, daß Harnstoff und Arginin (aus dem nach Arginasewirkung Harnstoff freigesetzt wird) bei der ureasefreien *T o r u l o p s i s* die Ornithincarbamoyl-transferase des Kreisprozesses nicht beeinflussen, beide Verbindungen aber bei der ureasehaltigen *E n d o m y c o p s i s* eine deutliche Förderung des Enzyms bewirken (vgl. auch die Förderung der Ornithincarbamoyl-transferase bei gleichzeitiger Induzierung der Arginase und Urease bei *N e u r o s p o r a c r a s s a*, M. CASTANEDA u. Mitarb. 1966).-Repressionen der Ornithincarbamoyl-transferase bei Mikroorganismen werden von J. BECHET u. Mitarb. (1962), H.I. LEHRER u. M.E. JONES (1962), R.B. FAANES u. P. ROGERS (1964) und B. DIXON u. A.H. ROSE (1964) beschrieben.

In den Aufwuchskulturen hatten beide Hefen auf Arginin als Substrat die höchste spezifische Aktivität der Arginase. Die Umpflanzkulturen hingegen zeigen, daß bei beiden Versuchsorganismen Citrullin die Synthese der Arginase doppelt so stark als

Arginin induziert. Umgekehrt liegen die Verhältnisse bei den "argininsynthetisierenden Enzymen": Das Endprodukt Arginin fördert die Enzymsynthesen bei beiden Organismen weitaus am stärksten.- Es müßte geprüft werden, inwieweit in den beiden vorgenannten Fällen die Konzentration des Substrates bzw. des Endproduktes für die Höhe der spezifischen Enzymaktivitäten eine Rolle spielt. R.T. SCHIMKE (1964) weist darauf hin, daß z.B. bei dem hemmenden oder fördernden Einfluß von Ornithin auf die "argininsynthetisierenden Enzyme" die Konzentration des Endproduktes in der Nährlösung von Bedeutung ist. Möglicherweise zeigt sich auch bei *Endomycopsis* ein Konzentrationseffekt darin (s. Abb. 27), daß die spezifische Aktivität dieses Enzymsystems in den ersten 12 Std. des Wachstums auf Arginin auf das Fünffache ansteigt, sich dann aber in den nächsten 12 Std. auf 40% des Höchstwertes vermindert.

Ein Vergleich der Abbildungen 29 (spezifische Aktivität der Arginase bei *Endomycopsis*) und 39 (spezifische Aktivität der Urease) zeigt praktisch gleichsinnige Förderungen der beiden Enzyme durch Harnstoff, Citrullin und Arginin. Beide Enzyme werden auch bei Wachstum auf Alanin, Glutaminsäure und Asparagin in gleicher Weise beeinflusst (s. Abb. 21 und 36). Es ist offensichtlich, daß die Urease-Synthese in engem Zusammenhang mit der Arginasebildung bzw. mit dem durch die Enzymwirkung freigesetzten Harnstoff erfolgt.

Die Urease-Aktivität wird auch durch Ammonium in der Nährlösung zunächst gefördert (6 und 12 Std. nach der Umpflanzung), jedoch im weiteren Verlaufe der Kulturdauer in steigendem Maße gehemmt. In diesem Zusammenhang sei auf die Versuche von C.KÖNIG

u. Mitarb. (1966) und C. KÖNIG u. H.G. SCHLEGEL (1967) verwiesen, die bei *Hydrogenomonas* H16 eine Repri-
mierung der Ureasebildung durch Ammoniumionen nachgewiesen
haben, die abhängig ist von der NH_4 -Konzentration im Medium.

Biuret ist für *Endomycopsis* eine gute N-Quelle. Die
Synthese der Enzyme des Ornithin-Cyclus wird durch dies Harn-
stoffderivat aber nicht gefördert, sondern in den meisten Fäl-
len sogar vollständig gehemmt; die Urease wird in ihrer spezi-
fischen Aktivität gegenüber dem Wert zu Beginn der Umpflanzung
nicht beeinflußt. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen wer-
den, daß Biuret nicht durch Urease (oder nur geringfügig) an-
gegriffen wird und die Spaltprodukte nicht - auch nicht ein
bestimmter Prozentsatz davon - über den Ornithin-Cyclus assi-
miliiert werden. Daß Biuret unter Mitwirkung anderer Enzyme ab-
gebaut und assimiliert wird, geht auch aus den Befunden von
H.L. JENSEN u. M. SCHRÖDER (1965) hervor, die fanden, daß die
Urease in *Rhizobium leguminosarum* konsti-
tutiv ist, während das Biuret abbauende Enzym induzierbar zu
sein scheint (vgl. auch H.L. JENSEN u. K.A. KUMARAN, 1965).

E. Z U S A M M E N F A S S U N G

Untersuchungen über die Ureasewirksamkeit:

1. Die Urease-Aktivität im Acetonpulver-Extrakt von *Endomycopsis vernalis* ist im Tris-SO₄-Puffer (pH-Wert 8,0) fünf- bis sechsmal höher als im Phosphat-Puffer (pH-Wert 6,7).
2. Die Hemmung der *Endomycopsis*-Urease durch p-Chlormercuribenzoat (p-CMB) wird im Phosphat-Puffer-Medium (wahrscheinlich im Zusammenwirken mit Enzymprotektoren des Acetonpulver-Extraktes) teilweise aufgehoben. Eine starke Protektorwirkung gegen die Hemmung durch p-CMB übt L-Cystein in geringen Konzentrationen sowohl für das hochgereinigte Ureasepräparat (Fa. Serva) als auch für die *Endomycopsis*-Urease aus.
3. Bei Anzucht von *Endomycopsis* auf L-Asparagin, Harnstoff oder L-Arginin als jeweils alleiniger N-Quelle ist die spezifische Aktivität der Urease wesentlich höher als beim Wachstum auf Ammoniumsuccinat und L-Ornithin.
4. Harnstoffderivate (Thioharnstoff, Äthylharnstoff, Methylharnstoff und Biuret) beeinflussen in relativ hohen Konzentrationen nicht die Ammoniakfreisetzung aus Harnstoff. Nur Phenylharnstoff (ab 20 µmol/ml) hemmt die Urease-Aktivität. Die Inhibitorwirkung ist wahrscheinlich durch den aromatischen Kern bedingt.
5. In Extrakten aus frischen Zellen, Acetonpulver-Extrakten (mit verschiedenen organischen SH-Gruppen-Protektoren und H₂S-Begasung) und in durch Sephadex-Säulentrennung gereinigten Fraktionen des Acetonpulver-Extraktes von *Torula*

l o p s i s konnte keine Urease-Aktivität festgestellt werden.

Untersuchungen über die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus bei *E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s* und *T o r u l o p s i s u t i l i s*:

1. Es wurden die spezifischen Aktivitäten der Enzyme (im Acetopulver-Extrakt) nach 3 1/2 Tage langer Kultur beider Versuchsorganismen auf verschiedenen N-Quellen miteinander verglichen;

Beim Wachstum auf Asparagin waren alle Enzyme des Ornithin-Cyclus in beiden Versuchsorganismen aktiv.

Auf Ammoniumsuccinat-Medium wird unter diesen Kulturbedingungen in beiden Hefen die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" vollständig gehemmt.

Harnstoff als N-Quelle fördert bei *E n d o m y c o p s i s* die Synthese aller Enzyme des Ornithin-Cyclus. Bei der ureasefreien *T o r u l o p s i s* hingegen unterbleibt bei dieser N-Quelle die Arginasesynthese (Repression des Enzyms durch "Endprodukthemmung").

Bei Wachstum auf Ornithin werden außer der Ornithincarbamoyltransferase alle anderen Enzyme des Kreisprozesses vollständig gehemmt.

Citrullin kontrolliert bei beiden Versuchsorganismen als Endprodukt die Ornithincarbamoyl-transferase-Synthese im Sinne einer Induktion.

Asparagin als N-Quelle induziert die Arginasebildung in beiden Hefen. Die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" wird durch Arginin stärker gefördert als es das Substrat für diese Synthese - Citrullin - bewirkt.

2. Werden die Versuchsorganismen N-arm auf Asparagin vorgezogen und die vorgezogenen Pilzdecken auf neue Nährlösungen mit den zu prüfenden N-Verbindungen als jeweilige N-Quelle umgepflanzt, so werden für einige Enzyme folgende abweichende Beeinflussungen (vgl. Punkt 1) im Verlaufe der Versuchsdauer von 24 Std. festgestellt:

Bei Umpflanzung auf Asparagin wird bei *T o r u l o p s i s* die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase nicht gefördert, die der Arginase wird stark gehemmt.

Ammoniumsuccinat als N-Quelle bewirkt bei *T o r u l o p s i s* eine Teilhemmung der Synthese aller Enzyme des Ornithin-Cyclus.

Bei der Umpflanzung von *E n d o m y c o p s i s* auf Ornithin werden außer der Arginase die anderen Enzymaktivitäten teilweise (Carbamoylphosphat-synthetase total) gehemmt; bei *T o r u l o p s i s* ist nur die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase vollständig gehemmt, jedoch sind die anderen Enzyme im Gegensatz zu den Ergebnissen der Aufwuchskulturen nicht unterdrückt.

Asparaginsäure und Glutaminsäure wurden zusätzlich geprüft. Sie hemmen bei beiden Versuchsorganismen die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase und bei *T o r u l o p s i s* noch die Synthese der "argininsynthetisierenden Enzyme". Die Wirkungen der N-Verbindungen auf die Synthese der Enzyme des Ornithin-Cyclus werden zusammen mit den Befunden anderer Autoren diskutiert.

3. Für die Synthese von Carbamylphosphat ist L-Glutamin ein besserer N-Donator als Ammoniumsulfat. N-Acetylglutamin-

säure hatte keinen Einfluß auf die Synthese.

4. Bei der Fettheife *E n d o m y c o p s i s* sind unter N-Mangelbedingungen ($1/4\%$ Asparagin in der Wöltje-Nährlösung) die spezifischen Aktivitäten aller Enzyme des Ornithin-Cyclus im Vergleich zum Wachstum auf 1% Asparagin verringert. Bei der Eiweißhefe *T o r u l o p s i s* hingegen ist bei N-Mangel ($1/2\%$ Asparagin) die Aktivität fast aller Enzyme zu jedem Zeitpunkt der Kulturdauer gegenüber der N-reichen Anzucht stark erhöht.
5. Im Gegensatz zu Harnstoff bewirken Harnstoffderivate (Biuret, Thioharnstoff, Phenylharnstoff) und Guanin deutliche bis vollständige Hemmungen der Synthesen der Enzyme des Ornithin-Cyclus bei *E n d o m y c o p s i s*.
6. Die im Verlaufe der Kulturdauer nach Wachstum auf Harnstoff, Ornithin, Citrullin und Arginin gefundenen Aktivitätskurven der Urease und Arginase gleichen auffallend einander. Offenbar steht die Ureasesynthese mit der Arginasebildung bzw. mit der Harnstoff-Freisetzung in einem engen Zusammenhang.

F. ARBEITSVORSCHRIFTEN

1. Ammoniakbestimmung nach der Conway-Methode

Es wurde die von E.J. CONWAY (1935) entwickelte und später verbesserte Methode (E.J. CONWAY u. E. O'MALLEY, 1942 und E.J. CONWAY, 1962) angewandt. Eine Glasschale mit einem Durchmesser von 75 mm und einer Höhe von ca. 15 mm, die durch einen geschliffenen Rand und Deckel luftdicht abgeschlossen ist, hat in der Mitte eine Kammer mit 30 mm Durchmesser und 10 mm Wandhöhe. Die innere Kammer wird mit 1,0 ml Borsäurelösung beschickt. Herstellung der Lösung: 5 g Borsäure werden in 200 ml Äthanol und 700 ml CO₂-freiem destilliertem Wasser gelöst, mit 10 ml Mischindikator (0,033% Bromkresolgrün und 0,066% Methylrot in Äthanol) versetzt, mit CO₂-freiem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und mit einigen Tropfen 1 n NaOH auf einen schwach roten Farbton eingestellt.

Zur quantitativen Bestimmung des Ammoniaks werden die Proben aus den Halbmikroreagenzgläsern in den äußeren Teil der Conway-Schalen gegeben; mit 0,5 ml deionisiertem Wasser wird nachgespült. In die mittlere Kammer wird 1,0 ml Borsäurelösung eingefüllt. Danach werden die Schalen mit einem gefetteten Schliffdeckel bis auf einen kleinen Spalt bedeckt, 1,0 ml gesättigte Kaliumcarbonatlösung (110 g Kaliumcarbonat in 100 ml Wasser) hinzugefügt und die Schale schnell verschlossen. Dann wird durch kreisende Bewegung auf glatter Unterlage vorsichtig durchmischt und die Schalen mindestens 10 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das durch die Ureasewirkung freigesetzte Ammoniak wird während dieser Zeit durch die Kaliumcarbonatlösung verdrängt und vom zentralen Borsäureein-

dikator absorbiert. Dieser wird mit $n/100$ HCl auf den Ausgangsfarbtön (schwach rot) zurücktitriert. Hierzu eignet sich besonders eine Spezialbürette, eine 0,2 ml Enzym-Test-Pipette mit $1/1000$ ml Graduierung und Kolbenmikrometergewinde. Die Ablesegenauigkeit dieser Kolbenbürette beträgt $\pm 1 \mu\text{l}$. Für die Umrechnung der Titrierwerte auf Harnstoff gilt:

$$1,0 \text{ ml } n/100 \text{ HCl} = 0,14 \text{ mg N} = 0,3 \text{ mg Harnstoff}$$

2. Aufstellung der Eichkurve zur Eiweißbestimmung

Das Eiweiß in den Acetonpulver-Extrakten wurde nach der Methode von D.H. LOWRY u. Mitarb. (1951) bestimmt. Hierzu werden folgende Reagenzlösungen benötigt.

Lösung A: 2% Natriumcarbonat (MG 106, Fa.Merck) in 0,1n NaOH;

Lösung B: 0,5% Kupfersulfat $\cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ (Fa.Merck) in Wasser;

Lösung C: 1% Kalium-Natriumtartrat (Fa.Merck) in Wasser.

Eiweißreagenzlösung: Mischung aus 50 ml Lösung A, 1 ml Lösung B und 1 ml C (die Eiweißreagenzlösung ist einen Tag haltbar).

Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (Fa.Merck).

Zur Herstellung einer Eichlösung werden 10 mg Serumalbumin vom Rind (Fa. Behringwerke) in Wasser gelöst und davon Verdünnungsreihen aufgestellt, so daß jeweils in 1 ml Eiweißkonzentrationen von 10 bis 80 γ enthalten sind. Zu jeder Eiweißprobe werden 5 ml Eiweißreagenzlösung hinzugefügt. Danach werden die Reaktionslösungen gut umgeschüttelt und 10 Min. lang stehengelassen. Dann wird je Probe 0,5 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz einpipettiert, gut durchgeschüttelt und nach 30 Min. (spätestens nach 2 Std.) die Transmission im Spektralphotometer bei 750 nm gegen die Reagenzlösung als Blindwert gemessen. Alle Messungen wurden als Parallelbestimmungen durchgeführt.

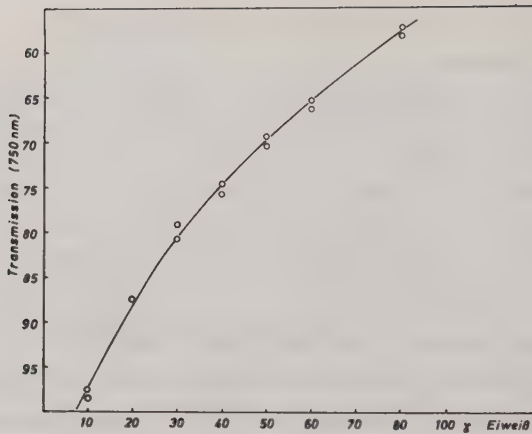


Abbildung 38: Eichkurve zur Eiweißbestimmung

Die Auftragung der Transmission gegen die Eiweißkonzentrationen pro ml Meßlösung ergab die Eichkurve in Abb.38. Sie diente zur Bestimmung der Eiweißwerte aller Enzymextrakte.

3. Berechnung einer spezifischen Enzymaktivität

Beispiel: Berechnung einer Urease-Aktivität

Verbrauch an n/100 HCl = 0,107 ml (=Differenz zwischen Probe und Kontrolle)

1,0 ml n/100 HCl = 0,3 mg (=300 γ) Harnstoff

MG von Harnstoff = 60,0

Eiweißmenge in 0,5 ml Extrakt = 185 γ

1,000 ml n/100 HCl entsprechen also 300 γ Harnstoff

0,107 ml n/100 HCl entsprechen dann x γ Harnstoff

$$\frac{300 \text{ } \gamma \text{ Harnstoff} \times 0,107 \text{ ml n/100 HCl}}{1,000 \text{ ml n/100 HCl}} = 32,1 \text{ } \gamma \text{ Harnstoff}$$

wenn 185 γ Eiweiß - 32,1 γ Harnstoff entsprechen
so entsprechen 1000 γ Eiweiß - x γ Harnstoff

$$\frac{32,1 \text{ } \gamma \text{ Harnstoff} \times 1000 \text{ } \gamma \text{ Eiweiß}}{185 \text{ } \gamma \text{ Eiweiß}} = 174 \gamma \text{ Harnstoff/mg Eiweiß}$$

Die Umrechnung in μmol Harnstoff ergibt sich folgendermaßen:

$$\begin{array}{lll} 60 \text{ } \gamma \text{ Harnstoff} & \text{entsprechen} & 1 \text{ } \mu\text{mol Harnstoff} \\ \hline 174 \text{ } \gamma \text{ Harnstoff} & \text{entsprechen} & x \text{ } \mu\text{mol Harnstoff} \\ \hline \frac{1 \text{ } \mu\text{mol Harnstoff} \times 174 \text{ } \gamma \text{ Harnstoff}}{60 \text{ } \gamma \text{ Harnstoff}} & = & 2,89 \text{ } \mu\text{mol Harnstoff} \end{array}$$

Die spezifische Urease-Aktivität beträgt also 2,89 μmol Harnstoff/mg Eiweiß, wobei nach dem Versuchsansatz die Reaktionsdauer 30 Min. bei 37°C betrug.

Nach diesen Berechnungen wurden aus den Analysenwerten der Enzymbestimmungen auch die spezifischen Aktivitäten der "argininsynthetisierenden Enzyme" und der Arginase ermittelt.

4. Herstellung der Substratlösung für die Bestimmung der Carbamoylphosphat-synthetase-Aktivität (K. KLECZKOWSKI, 1965)

Es werden unter Eiskühlung in 15 ml Wasser gelöst:

- 600 mg Adenosin-5'-triphosphat-Na-Salz (ATP) (Fa.Boehringer)
- 206,1 mg Phosphoenol-pyruvat-K-Salz (Fa.Boehringer)
- 168,6 mg L-Ornithiniummonochlorid (Fa.Merck)
- 740 mg Magnesiumsulfat $\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ (Fa.Merck)

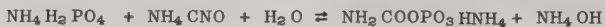
Mit kalter 0,5 n Natronlauge wurde auf den pH-Wert 7,6 eingestellt und mit kaltem Wasser auf 40 ml ergänzt. In 0,2 ml dieser Lösung ist dann die für jede Probe erforderliche Substratmenge enthalten. Die Lösung ist in Portionen von 4 ml im Tiefkühlschrank bei -25°C einige Wochen haltbar und kann bei Gebrauch aufgetaut werden.

5. Herstellung von Diammonium-carbamylphosphat

Die Herstellung erfolgte nach der von METZENBERG u. Mitarb. (1960) gegebenen Vorschrift. Benötigt werden an Reagenzien:

250,0 g Dowex
32,4 g Kaliumcyanat
23,0 g Ammoniumdihydrogenphosphat
23 ml Eisessig
240 ml Ammoniak (2 mol)
2000 ml Äthanol (95%)

Die Synthese von Carbamylphosphat erfolgt durch folgende Umsetzung:



Durch Neutralisation der Base mit Essigsäure wird das Gleichgewicht zugunsten des Carbamylphosphats verschoben. Das Produkt kristallisiert in Form des Diammoniumsalzes.

Arbeitsvorschrift: In einer Säule von 4 cm Durchmesser wird etwa 12,5 cm hoch Dowex 50 (NH_4^+ -Form, 200 Mesh) eingefüllt. 100 ml einer 4 molaren Kaliumcyanat-Lösung wurden auf die Säule gegeben. Die ersten 40 ml Durchlauf werden verworfen; die restlichen 60 ml werden aufgefangen und die Säule mit 140 ml deionisiertem Wasser gewaschen. Die beiden letzten vereinigten Eluate ergeben eine 2 molare Ammoniumcyanat-Lösung. Dieses Produkt wird in einem Wasserbad unter kräftigem Rühren auf 37°C gebracht und 23 g Ammoniumdihydrogenphosphat unter weiterem Rühren hinzugefügt. Nach 5 Min. werden tropfenweise (ca. 5 Min. lang) 23 ml Eisessig zugegeben. Danach wird die Lösung sofort in 500 ml deionisiertes Wasser von 1°C gegossen, schnell 240 ml eiskalte 2 molare Ammoniak-Lösung hinzugefügt und mit kaltem Wasser auf 1 L aufgefüllt. Unter Umrühren werden jetzt 1,5 L Äthanol von ca. 0°C hinzugefügt. Es entsteht eine milchige Trübung. Nochmals werden 500 ml kaltes Äthanol zugegeben und die Lösung für 1 Std. unter gelegentlichem Um-

rühren in ein Eisbad gestellt. Das ausgefallene Ammoniumhydrogenphosphat wird mittels einer groben Glasfritte G 2 (Wasserstrahlpumpe) von der Lösung abgetrennt und verworfen. Zum Auskristallisieren wird die Lösung 48 Std. lang bei -25°C in einen Tiefkühlschrank gestellt. Die Kristalle werden auf einem Papierfilter gesammelt, mit Äthanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Zum Umkristallisieren wird eine 4%ige wäßrige Salzlösung hergestellt und zu dieser die doppelte Menge 0°C kaltes Äthanol (95%) hinzugefügt. Nach weiteren 48 Std. Aufbewahrung im Tiefkühlschrank wird erneut filtriert und gewaschen. Die gebildeten, großen, glänzenden Flocken des Diammonium-carbamylphosphats werden über Phosphorpentoxyd für 24 Std. im Vakuumexsikkator bei Zimmertemperatur getrocknet. Das Präparat ist, wenn es kühl über einem Trocknungsmittel aufbewahrt wird, mehrere Wochen haltbar.

Die Reinheit des Präparates kann parallel mit der Ornithin-carbamoyl-transferase-Bestimmung mit Hilfe des Acetonpulver-Extraktes enzymatisch geprüft werden. Hierzu werden die Konzentrationen von L-Ornithin und des Diammonium-carbamylphosphats auf $5\text{ }\mu\text{mol}$ reduziert, um eine vollständige Umsetzung zu erzielen.- Die enzymatische Prüfung ergab, daß das Präparat nahezu 100%ig rein war.

6. Aufstellung der Eichkurve zur Citrullinbestimmung

Die Citrullinbestimmung wurde nach der von R.M. ARCHIBALD (1944) beschriebenen Methode durchgeführt. Folgende Reagenzien werden hierzu benötigt:

3%ige wäßrige Diacetylmonoximlösung (Fa. Schuchardt)
Citrullin-Reagenz-Lösung:

100 ml Schwefelsäure (95 - 97%, Fa. Merck)

300 ml o-Phosphorsäure (85%, Fa. Merck)

Die beiden Säuren werden gemischt und vorsichtig mit deionisiertem Wasser auf 1 L aufgefüllt. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur werden darin 5×10^{-5} Mol Eisen-III-chlorid gelöst. Zur Aufstellung der Eichkurve wird die Farbintensität einer Citrullinlösung (L-Citrullin, Fa. Serva) mit zwei Reagenzien bestimmt. Die quantitative Bestimmung wird nach der von R.M. ARCHIBALD (1944) beschriebenen Methode auf das Absorptionsmaximum bei 490 nm abgestellt. Als Standard werden 10 mg Citrullin in Wasser gelöst und davon Verdünnungsreihen aufgestellt, die pro 1 ml Lösung Citrullinkonzentrationen von 6 bis 80 γ enthalten. In Reagenzgläsern (1,5 x 16 cm) werden zu jeder Probe 5 ml Citrullin-Reagenz-Lösung und 0,25 ml Diacetylmonoximlösung hinzugefügt. Danach werden die Gläser gut geschüttelt und mit Gummistopfen verschlossen, die zum Druckausgleich durchbohrt sind. Die Proben werden 15 Min. in einem verschlossenen Kochtopf im siedenden Wasser erhitzt, danach in Eiswasser abgekühlt und das Reaktionsprodukt bei 490 nm im Spektralphotometer (PMQ II, Fa. Zeiss) gegen den Blindwert der Reagenzlösungen gemessen. Hierbei ist zu beachten, daß der gelbliche bis rötliche Farbkomplex lichtempfindlich ist und sich allmählich zersetzt. Es empfiehlt sich deshalb, in einem abgedunkelten Raum zu arbeiten und die Messung innerhalb von 20 Min. durchzuführen.

Abb.39 gibt die Eichkurve zur Citrullinbestimmung wieder, wobei die Transmission gegen die Konzentration der Aminosäure pro 1 ml Meßlösung aufgetragen wurde.

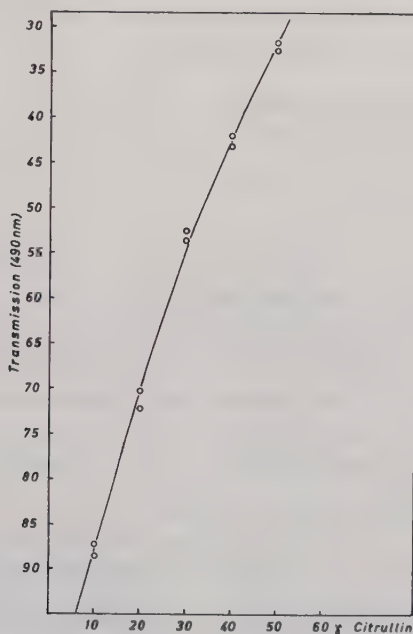


Abbildung 39: Eichkurve zur Citrullinbestimmung

Zur Citrullinbestimmung beim Aktivitätsnachweis der Carbamoylphosphat-synthetase und der Ornithincarbamoyl-transferase in Enzymextrakten werden die abzentrifugierten Probelösungen (s. Methodenteil S. 11) aus den Halbmikroreagenzgläsern in normale Reagenzgläser (1,5 x 16 cm) dekantiert, 5 ml Citrullin-Reagenz-Lösung und 0,25 ml Diacetylmonoximlösung hinzugefügt. Danach wird die Bestimmung, so wie es bei der Aufstellung der Eichkurve beschrieben (s.S. 96) worden ist, weitergeführt.

Nach den Transmissionswerten kann die Menge des gebildeten Citrullins aus der Eichkurve in γ -Werten entnommen werden.

Die Umrechnung auf spezifische Aktivität, ausgedrückt in μmol Citrullin/mg Eiweiß, soll am Beispiel der Ornithincarbamoyl-transferase-Aktivität gezeigt werden.

Aus der Eichkurve entnommene

Menge gebildetes Citrullin = 11,0 γ (=Differenz zwischen Probe und Kontrolle)

Eiweißmenge in 0,2 ml Extrakt = 33,0 γ

MG von Citrullin = 175,0

33 γ Eiweiß	entsprechen also	11 γ Citrullin
1000 γ Eiweiß	entsprechen dann	x γ Citrullin

$$\frac{11 \gamma \text{ Citrullin} \times 1000 \gamma \text{ Eiweiß}}{33 \gamma \text{ Eiweiß}} = 334 \gamma \text{ Citrullin/mg Eiweiß}$$

Die Umrechnung in μmol ergibt sich folgendermaßen:

175 γ Citrullin entsprechen 1 μmol Citrullin

334 γ Citrullin entsprechen x μmol Citrullin

$$\frac{1 \mu\text{mol Citrullin} \times 334 \gamma \text{ Citrullin}}{175 \gamma \text{ Citrullin}} = 1,9 \mu\text{mol Citrullin/mg Eiweiß}$$

Die spezifische Aktivität der Ornithincarbamoyl-transferase beträgt also 1,9 μmol Citrullin/mg Eiweiß, wobei nach dem Versuchsansatz die Reaktionsdauer 15 Min. bei 37°C betrug. Nach diesem Beispiel wurde auch die spezifische Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase berechnet.

7. Herstellung der Substratlösung zur Bestimmung der Aktivität der "argininsynthetisierenden Enzyme"

Die Herstellung der Substratlösung erfolgte nach der von S. RATNER (1955) beschriebenen Methode. Folgende Reagenzien werden hierzu benötigt:

- 600 mg Adenosin-5'-triphosphat-Na-Salz (ATP) (Fa.Boehringer)
350 mg L-Citrullin (Fa.Serva)
266,2 mg L-Asparaginsäure (Fa.Merck)
494 mg Magnesiumsulfat $\cdot$ 7 H₂O (Fa.Merck)

Alle Substanzen werden unter Eiswasserkühlung in 15 ml Wasser gelöst und mit kalter 0,5 n Natronlauge auf den pH-Wert 7,4 eingestellt. Danach ergänzt man mit kaltem Wasser zu 40,0 ml. In 0,2 ml dieser Lösung ist die für jede Probe erforderliche Substratmenge enthalten. Die Lösung ist in Portionen von 4 ml im Tiefkühlschrank bei -25°C einige Wochen haltbar und kann bei Gebrauch aufgetaut werden.

8. Herstellung der Arginasepräparatlösung

5 mg Arginase (Fa. Sigma) und 112 mg Kobalt(II)-sulfat (Fa. Merck) werden in 8 ml Eiswasser gelöst und in Vorratsproben zu je 2 ml bei -25°C eingefroren. Kurz vor Gebrauch wird die Lösung aufgetaut.

9. Herstellung der Ureasepräparatlösung

5 mg Urease "Merck" werden in 1 ml eines 0,1 molaren Phosphat-Puffers mit dem pH-Wert 6,7 gelöst, im Kühlschrank aufbewahrt und zum Gebrauch davon 0,1 ml auf 1 ml mit Wasser verdünnt. 0,1 ml dieser Lösung enthält 50 γ Urease.

10. Herstellung des Maleinsäure-NaOH-Puffers zur Arginase-Aktivitätsbestimmung

Maleinsäure-NaOH-Puffer mit MnSO₄-Zusatz: 5,8 g Maleinsäure (Fa. Merck) werden in 500 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit 0,1 n NaOH auf den pH-Wert 9,7 bis 9,8 eingestellt. Zu diesem Puffer werden 25 ml einer 2 molaren MnSO₄-Lösung gegeben und mit Wasser auf 1 L aufgefüllt. Der pH-Wert des gebrauchsfertigen Puffers ist 7,0.

G. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- ARCHIBALD, R.M.: Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. *J. Biol. Chem.* 156, 121-142 (1944).
- BACH, S.J. und J.D. KILLIP: Purification and cristallisation of arginase. *Biochim. Biophys. Acta* 29, 273-280 (1958).
- BECHET, J., J.M. WIAME und M. DE DEKEN-GRENSON: Régulation de la synthèse de l-ornithine transcarbamylase chez *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Intern. physiol. Biochim.* 70, 564-565 (1962).
- BERNLOHR, R.W.: Ornithine transcarbamoylase enzymes: Occurrence in *Bacillus licheniformis*. *Science* 152, 87-88 (1966).
- BOLLARD, E.G.: Urease, urea and ureides in plants. *Symp. Soc. Exptl. Biol.* 13, 193-209 (1959).
- BROWN, JR., G.W. und P.P. COHEN: Comparative biochemistry of urea synthesis. I. Methods for the quantitative assay of urea cycle enzymes in liver. *J. Biol. Chem.* 234, 1769-1774 (1959).
- BURECZEWSKI, S., K. KLECZKOWSKI und I. REIFER: Argininosuccinase in the green Pea, Reygrass and Wheat. *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.* 7, 93-95 (1960).
- CARAVACA, J. und S. GRISOLIA: Synthesis of citrulline with animal and bacterial enzymes. *J. Biol. Chem.* 235, 684-693 (1960).
- CASTANEDA, M., J. MARTUSCELLI und J. MORA: The catabolism of L-arginine by *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta* 141, 276-286 (1967).
- CONWAY, E.J.: Apparatus for the micro determination of certain volatile substances. IV. The blood ammonia, with observations on normal human blood. *Biochem. J.* 29, 2755-2772 (1935).
- - Microdiffusion analysis and volumetric error. London 1962.
- CONWAY, E.J. und E. O'MALLEY: Microdiffusion Methods. Ammonia and urea using buffered absorbents (revised methods for ranges greater than 10 µg N). *Biochem. J.* 36, 655-661 (1942).
- COOK, A.R. und D. BOULTER: Utilisation of urea by *Candida flaveri*. *Phytochemistry* 3, 313-319 (1964).

- DABROWSKA, M., K. KLECZKOWSKI und I. REIFER: Urease activity in plants. *Acta Soc. Botan. Polon.* 35, 257-264 (1966).
- DAVIS, R.H.: Carbamyl phosphate synthesis in *Neurospora crassa*. II. Genetics, metabolic position and regulation of arginine-specific carbamyl phosphokinase. *Biochim. Biophys. Acta* 107, 54-68 (1964).
- DAVISON, D.C. und W.H. ELLIOTT: Enzymic reaction between arginine and fumarate in plant and animal tissues. *Nature* 169, 313-314 (1952).
- DIXON, B. und A.H. ROSE: The synthesis of ornithine carbamoyl-transferase in biotin deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *J. gen. Microbiol.* 34, 229-240 (1964).
- DONACHIE, W.D.: The regulation of pyrimidine biosynthesis in *Neurospora crassa*. I. End-product inhibition and repression of aspartate carbamoyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 82, 284-292 (1964).
- ECKERT, L., K. KLECZKOWSKI und H. KATING: Untersuchungen zum Stoffwechsel des Harnstoffs in Mikroorganismen. V. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus bei *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis* in Abhängigkeit von der N-Quelle. *Arch. Microbiol.* 55, 54-65 (1966).
- FAANES, R.B. und P. ROGERS: Derepression of ornithine trans-carbamylase synthesis by *Escherichia coli* in the presence of arginine. *Bact. Proc.* 1964, S. 83
- FASMAN, G.D. und C. NIEMAN: A reinvestigation of the kinetics of the ureasecatalysed hydrolysis of urea. I. The activity of urease in the presence of Na- and K-phosphate. *J. Amer. Chem. Soc.* 73, 1646-1650 (1951).
- FINCHAM, J.R.S. und J.B. BOYLEN: A block in arginine synthesis in *Neurospora crassa* due to gene mutation. *Biochem. J.* 61, xxiii - xxiv (1955).
- FISHBEIN, W.N. und P.P. CARBONE: Urease catalysis. II. Inhibition of the enzyme hydroxyurea, hydroxylamine and acetohydroxamic acid. *J. Biol. Chem.* 240, 2407-2414 (1965).
- FISHBEIN, W.N., T.S. WINTER und J.D. DAVIDSON: Urease catalysis. I. Stoichiometry, specificity and kinetics of the second substrate: Hydroxyurea. *J. Biol. Chem.* 240, 2402-2406 (1965).
- GORINI, L.: Antagonism between substrate and repressor in controlling the formation of biosynthetic enzyme. *Proc. nat. Acad. Sci.* 46, 682-690 (1960).

- GORINI, L.: Symposium on multiple forms of enzymes and control mechanism. III. Control by repression of the biochemical pathway. Bact. Rev. 27, 182-190 (1963).
- GORINI, L., M. GUNDERSEN und M. BURGER: Genetics of regulation of enzyme synthesis in the arginine biosynthetic pathway of *Escherichia coli*. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 26, 173-182 (1961).
- GRASSMANN, W. und A. MÜLLER: Amidasen. In: B. FLASCHENTRÄGER und E. LEHNARTZ: Physiologische Chemie 1, 1100-1170. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1951.
- GREENBERG, D.M.: Arginase. In: S.P. COLOWICK und N.O. KAPLAN: Methods in Enzymology 2, 368-371. New York-London 1955.
- HEIDE, S.: Zur Physiologie und Cytologie der Fettbildung bei *Endomycopsis vernalis*. Arch. Mikrobiol. 10, 135-188 (1939).
- HIORT, U., K. KLECZKOWSKI und H. KATING: Untersuchungen zum Stoffwechsel des Harnstoffs in Mikroorganismen. VI. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus in *Micrococcus denitrificans*. Beij. Arch. Mikrobiol. 55, 311-319 (1967).
- JENSEN, H.L. und K.A. KUMARAN: Transformation microbiologique du biuret. Ann. Inst. Pasteur, Suppl. No. 3, 184-190 (1965).
- JENSEN, H.L. und M. SCHRÖDER: Urea und biuret as nitrogen sources for *Rhizobium* spp. J. appl. Bact. 28, 473-478 (1965).
- JONES, M.E., L. SPECTOR und F. LIPMAN: Carbamyl phosphate, the carbamyl donor in enzymatic citrulline synthesis. J. Amer. Chem. Soc. 77, 819-820 (1955).
- KASTING, R. und C.C. DELWICHE: Ornithine, citrulline and arginine metabolism in watermelon seedlings. Plant Physiol. 32, 350-354 (1958).
- KATING, H.: Die Nutzung verschiedener N-Quellen durch *Endomycopsis vernalis*. Arch. Mikrobiol. 22, 235-247 (1955a).
- - Über die Aktivität der Zelloberfläche bei der Assimilation von Amino- und Amidstickstoff durch *Endomycopsis vernalis*. Arch. Mikrobiol. 22, 368-395 (1955b).
- - Untersuchungen über den Stoffwechsel des Harnstoffs bei Mikroorganismen. I. Zur Harnstoffsynthese bei *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis*. Biochem. Z. 335, 351-365 (1962a).

- KATING, H.: Untersuchungen über den Stoffwechsel des Harnstoffs bei Mikroorganismen. II. Die Verarbeitung des Harnstoffs bei *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis*. *Biochem. Z.* 335, 366-381 (1962b).
- - Harnstoff-Synthese über den Ornithin-Cyclus in jungen Gerstenwurzeln. *Biochem. Z.* 336, 489-494 (1963).
- KISTIAKOWSKY, G.B. und W.H.R. SHAW: On the mechanism of the inhibition of urease. *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 866-871 (1953).
- KLECZKOWSKI, K.: Biosynthesis of citrulline in bean seedlings. *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Biol.* 5, 83-87 (1957).
- - L-Glutamine as donor of carbamoyl group nitrogen for the enzymic synthesis of citrulline in green pea seedlings. *Acta Biochim. Pol.* 12, 243-249 (1965).
- KLECZKOWSKI, K. und P.P. COHEN: Purification of ornithintranscarbamylase from pea seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* 107, 271-278 (1964).
- KÖNIG, C., H. KALTWASSER und H.G. SCHLEGEL: Die Bildung von Urease nach Verbrauch der äußeren N-Quelle bei *Hydrogenomonas H16*. *Arch. Mikrobiol.* 53, 231-241 (1966).
- KÖNIG, C. und H.G. SCHLEGEL: Oscillationen der Ureaseaktivität von *Hydrogenomonas H16* in statischer Kultur. *Biochim. Biophys. Acta* 139, 182-185 (1967).
- KOSSMANN, T., K. LANGE und F. MENNE: Anreicherung von Arginase aus Schweinelungen. *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 335, 250-254 (1964).
- KREBS, H.A. und K. HENSELEIT: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 210, 33-66 (1932).
- LACROUTE, F., A. PIÉRARD, M. GRENSON und J.M. WIAME: The biosynthesis of carbamoyl phosphate in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. gen. Microbiol.* 40, 127-142 (1965).
- LEHRER, H.I. und M.E. JONES: Repression of ornithine transcarbamoyltransferase of *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 65, 360-362 (1962).
- LEVENBERG, B.: Role of L-glutamine as donor of carbamyl nitrogen for the enzymatic synthesis of citrulline in *Agaricus bisporus*. *J. Biol. Chem.* 237, 2590-2598 (1962).
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR und R.J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951).

- MAAS, W.K. und E. MCFALL: Genetic aspects of metabolic control. *Ann. Rev. Microbiol.* 18, 95-110 (1964).
- METZENBERG, R.L., M. MARSHALL und P.P. COHEN: Carbamoyl phosphate synthetase: Studies on the mechanism of action. *J. Biol. Chem.* 233, 1560-1564 (1958).
- - Carbamyl phosphate. *Biochemical preparations* 7, 23-26. New York 1960.
- MOKRASCH, L.C., J. CARAVACA und S. GRISOLIA: A highly active carbamate kinase and its application to the regeneration and preparation of [^{32}P] adenine nucleotides. *Biochim. Biophys. Acta* 37, 442-447 (1960).
- MOTHES, K.: Ein Beitrag zur Assimilation N-haltiger Verbindungen durch Bäckerhefe. *Planta* 42, 64-80 (1953).
- - The metabolism of urea and ureides. *Can. J. Botany* 39, 1785-1807 (1961).
- MÜLLER, E.: Beiträge zur Physiologie und Biochemie des Harnstoffs bei Pflanzen. *Nova Acta Leopoldina* 24, 1-74 (1961).
- NICOLOFF, T.: Zur Frage der Identität der pflanzlichen Urease mit der Magenurease. II. Ein spezifischer Inaktivator der Magenurease im Blutserum. *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 309, 180-183 (1957).
- PIÉRARD, A., M. GLANSDORFF, M. MERGEAY und J.W. WIAME: Control of the biosynthesis of carbamoyl phosphate in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 14, 23-36 (1965).
- RAMALEY, R.F. und R.W. BERNLOHR: Apparent induction of ornithine transcarbamylase and arginase by arginine in *Bacillus licheniformis*. *J. Mol. Biol.* 11, 842-844 (1965).
- RATNER, S.: Enzymatic synthesis of arginine (condensing and splitting enzymes). In: S.P. COLOWICK und N.O. KAPLAN: *Methods in Enzymology* 2, 356-367. New York-London 1955.
- RATNER, S. und B. PETRACK: Biosynthesis of urea. III. Further studies on the arginine synthesis from citrulline. *J. Biol. Chem.* 191, 693-705 (1951).
- RAVEL, J.M., J.S. HUMPHREYS und W. SHIVE: A study of carbamyl phosphate synthesis in *Streptococcus lactis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 92, 525-531 (1961).
- REIFER, I. und L. BURACZEWSKA: The ornithine cycle in pea seedlings. *Acta Biochim. Pol.* 5, 361-371 (1958).
- REIFER, I. und K. KLECZKOWSKI: Enzymatische und nichtenzymatische Citrullinsynthese. *Ztschr. f. Naturforsch.* 15b, 431-434 (1960).

- REIFER, I. und G. MORAWSKA: An arginase inhibitor from sunflower seeds (*Helianthus annuus*). *Acta Biochim. Pol.* 10, 413-418 (1963).
- REIFER, I. und B. WIELGAT: Further studies on the urease inhibition from poplar leaves (*Populus berolinensis*). *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.* 11, 499-503 (1964).
- REUTER, G.: Reaktionen mit Carbamylphosphat unter zellmöglichen Bedingungen. *Ztschr. f. Naturforsch.* 14b, 475-476 (1959).
- ROCHE, J. und G. LACOMBE: Sur l'argininedésimidase et sur la formation enzymatique de citrulline par le levures. *Biochim. Biophys. Acta* 2, 687-692 (1952).
- SCHIMKE, R.T.: Repression of enzymes of arginine biosynthesis in mammalian tissue culture. *Biochim. Biophys. Acta* 62, 599-601 (1962).
- - Enzymes of arginine metabolism in mammalian cell culture. I. Repression of argininosuccinic synthetase and argininosuccinase. *J. Biol. Chem.* 239, 136-145 (1964).
- SRB, A.M. und N.N. HOROWITZ: The ornithine cycle in *Neurospora crassa* and its genetic control. *J. Biol. Chem.* 154, 129-139 (1944).
- STAUFF, J. und R. JAENICKE: Physikalische Chemie der Lösungen. In: H.M. RAUEN: *Biochem. Taschenbuch*, S. 97. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964.
- STEINER, M. und H. KATING: Harnstoffassimilation mit und ohne Ureasewirkung bei Mikroorganismen (*Endomycopsis vernalis*, *Torulopsis utilis*, *Willia anomala*). *Arch. Mikrobiol.* 28, 173-190 (1957).
- - Weitere Untersuchungen zur Kenntnis der Harnstoffassimilation bei *Torulopsis utilis* und *Endomycopsis vernalis*. *Flora* 150, 294-305 (1961).
- SUMNER, J.B.: Urease. In: S.P. COLOWICK und N.O. KAPLAN: *Methods in Enzymology* 2, 178-379. New York 1955.
- UDAKA, S.: Pathway-spezifische pattern of control of arginine biosynthesis in bacteria. *J. Bact.* 91, 617-621 (1966).
- VOGEL, H.J. und D.M. BONNER: The use of mutants in the study of metabolism. In: W. RUHLAND: *Handbuch der Pflanzenphysiologie* 11, 1-32. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959.
- WALKER, J.B.: Argininosuccinic acid from *Chlorella*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 38, 561-569 (1952)

- WALL, M.C. und K.J. LAIDLER: The molecular kinetics of the urea urease system. IV. The reaction in an inert buffer. Arch. Biochem. Biophys. 43, 299-306 (1953).
- WITT, I. und H. HOLZER: Hauptweg des NH_4^+ -Einbaues in Glucose-oxydierender Bäckerhefe. Biochem. Z. 339, 255-265 (1964).
- WÖLTJE, W.: Unterscheidung einiger Penicillium-Species nach physiologischen Merkmalen. Zbl. Bakt., II. Abt. 48, 97-130 (1918).

Herrn Professor Dr. H. Kating danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine stete Hilfsbereitschaft und Förderung, die er mir hat zuteil werden lassen.- Ferner möchte ich Herrn Dozent Dr. K. Kleczkowski (Institut für Biochemie und Biophysik der Polnischen Akademie der Wissenschaften Warschau, Polen) für wertvolle Ratschläge zur Methode und anregende Diskussionen an dieser Stelle danken.

Lebenslauf

Am 2. September 1938 wurde ich als Sohn des Landwirts Johann Eckert und seiner Ehefrau Margarete, geb. Giebenhain, in Weiten-Gesäss (Odenw.) geboren.

Von Herbst 1944 bis Ostern 1950 besuchte ich die Volksschule am gleichen Ort und anschließend das Realgymnasium in Michelstadt (Odenw.), an dem ich am 27. Februar 1959 die Reifeprüfung ablegte.

Am 1. April 1959 trat ich als Praktikant in die Starkenburg-Apotheke in Heppenheim ein und bestand am 9. März 1961 in Darmstadt die Pharmazeutische Vorprüfung. Danach arbeitete ich sieben Monate als Vorexaminierter in der Schwanen-Apotheke in Darmstadt-Eberstadt.

Ab WS 1961/62 studierte ich Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg/Lahn. Hier legte ich nach sechs Semestern am 9. Oktober 1964 die Pharmazeutische Prüfung ab. Vom 1. November 1964 bis 30. April 1965 absolvierte ich sechs Monate meiner Kandidatenzeit in der Hirsch-Apotheke in Peckelsheim (Westf.).

Im Mai 1965 begann ich am Institut für Pharmakognosie unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Kating die vorliegende Arbeit, die ich im März 1968 zum Abschluß brachte.

